

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen über die Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter Metalcaligenes*!

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Machthild Keulmann
aus Bad Hersfeld

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siebert

Untersuchungen über die Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter Metalcaligenes*!

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von
Machthild Keulmann
aus Bad Hersfeld

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am 16.12.1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan Professor Dr. med. W. Straub
Referent Dozent Dr. med. W. Mannheim
Correferent Professor Dr. med. et Dr. med.
dent. H. Heuser



INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<u>A. Einleitung</u>	1- 7
I. Vorkommen und Biosynthese zyklischer Tetrapyrrole	1
II. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	6
<u>B. Material und Methoden</u>	8-32
I. Mikrobiologischer Teil	8
a) Testkeim	8
b) Medien	8
c) Produktionssysteme	8
II. Chemischer Teil	11
Isolierung und Bestimmung der Porphyrine und des Protohämins	
a) Reagenzien und Lösungsmittel	11
b) Apparate	11
c) Methoden	11
1) Veresterung der Porphyrine und des Hämins	11
2) Extraktion der Tetrapyrrolmethylester	13
3) Dünnschichtchromatographie	13
4) Spektrophotometrische Bestimmung	17
d) Richtigkeit der Methodik	25
e) Einfluß von Zeit und Temperatur auf die Veresterung	26
f) Vergleichende Ausbeutebestimmung an intakten und desintegrierten Zellen	26
g) Isomerenanalyse von Copro- und Uroporphyrin	32

C. Ergebnisse und Besprechung

33-57

I. Verteilung der Porphyrine zwischen Zellen und Medium	35
II. Einfluß der Belüftung auf die Porphyrinsynthese	36
III. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Tetrapyrrolsynthese	40
a) Riboflavin und 3-Amino-1,2,4-triazol	40
b) Purinderivate	45
c) Vitamin B ₆	47
d) Inhibitoren und Schwermetalle	48
e) Pharmaka und Chemotherapeutika	53

D. Zusammenfassung

58-59

E. Literatur

60-70

A. EINLEITUNG

I. Vorkommen und Biosynthese zyklischer Tetrapyrrole

Im Jahre 1871 bezeichnete HOPPE-SEYLER⁴⁷ eine Substanz des Gemisches, das MULDER⁷⁶ 1844 als "eisenfreies Hämatin" beschrieb, als Hämatoporphyrin. Die kristalline, rotbraune Substanz war das erste isolierte Porphyrin, das THUDICHUM¹¹⁴ 1867 mit Hilfe konzentrierter Schwefelsäure aus Blut darstellte, physikalisch charakterisierte (Fluoreszenz) und "cruentine" nannte. NENCKI und SIEBER⁷⁷ erkannten das Hämatoporphyrin als ein Derivat des Protophämins, der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins, und beschrieben zu seiner Herstellung aus Blut ein reproduzierbares Verfahren, das auch heute noch verwendet wird. Hämatoporphyrin wurde inzwischen eingehender charakterisiert¹².

Die chemische Struktur der in der Natur vorkommenden Porphyrine wurde von HANS FISCHER und seiner Schule aufgeklärt. FISCHER und ORTH²⁶ stellten fest, daß durch Säureeinwirkung aus dem Blut nicht Hämatoporphyrin, sondern zuerst Protoporphyrin entsteht. Neben einer Vielzahl von Pyrrolverbindungen, insbesondere Tetrapyrrolen, synthetisierte FISCHER auch Protophämin und zwölf Isomere des Protoporphyrins. Das Isomer IX stimmte mit dem biologisch vorkommenden Protoporphyrin und Protophämin überein.

Porphyrine kommen nicht nur in animalischen Zellen, sondern auch in Pflanzen- und Bakterienzellen vor. Sie bilden als Metallporphyrine die prosthetische Gruppe (Eisen-Protoporphyrin) des Hämoglobins und anderer Hämoproteine wie der Cytochrome, der Catalase und Peroxydase (Eisen-Porphyrin-Verbindungen) sowie der Chlorophylle (Magnesium-Tetrapyrrole mit einem zusätzlichen Cyclopentanring und einem langkettigen Alkohol). Gegenüber den in der Natur am stärksten vertretenen Biopigmenten Hämoglobin und Chlorophyll sind die Cytochrome der Zelle, die eine zentrale Funktion für die biologische Oxydation innehaben, in wesentlich niedrigeren Konzentrationen vorhanden. Mit Ausnahme einiger streng anaerober Bakterien und Lactobazillen, die ihre Energie durch Fermentation organischer Substrate beziehen, benötigt die Zelle Metall-Porphyrin-Proteine unmittelbar für ihren Energiestoffwechsel. Hämoglobine sind für den Sauerstoff-, Cytochrome für den Elektronentransport und Chlorophylle für die Aufnahme und Umwandlung von Strahlenenergie zur Photosynthese erforder-

lich. Außerdem kommen Porphyrine in der Natur als Pigmente ohne weitere biologische Funktion vor, wie zum Beispiel das Turazin, ein Kupfersalz des Uroporphyrins, als Federfarbstoff der Helmvögel. Beim animalischen Organismus wurden die Porphyrine bisher vorwiegend im Knochenmark, in den Erythrocyten des peripheren Blutes, in Leber, Urin und Faeces untersucht. Freie Porphyrine sind Nebenprodukte der Biosynthese, die unter physiologischen Stoffwechselbedingungen nur in geringen Mengen auftreten und keine biologische Funktion haben.

Angeregt durch die klinische Porphyrieforschung GÜNTHERS⁴², der 1911 eine in ihren Grundzügen noch heute gültige Klassifizierung der Porphyrinen vornahm, untersuchte FISCHER^{24, 26} die Urinporphyrine des Patienten PETRY⁶, der an einer congenitalen erythropoetischen Porphyrrie erkrankt war. Die Untersuchungen ergaben, daß unter normalen und pathologischen Stoffwechselbedingungen nicht Hämatoporphyrin, sondern Copro- und Uroporphyrin ausgeschieden werden. Das als Hämatoporphyrin bezeichnete Porphyrin erwies sich als Kunstprodukt. FISCHER klärte die chemische Konstitution des im Hämoglobin vorhandenen Porphyrins auf und nannte es Protoporphyrin. Ausgehend von den chemischen Kenntnissen gab WALDENSTRÖM 1937¹¹⁷ eine Übersicht über die Porphyrinen mit einer den neuen Kenntnissen entsprechenden Klassifikation, die in ihren Grundzügen gegenwärtig noch verwendet wird.

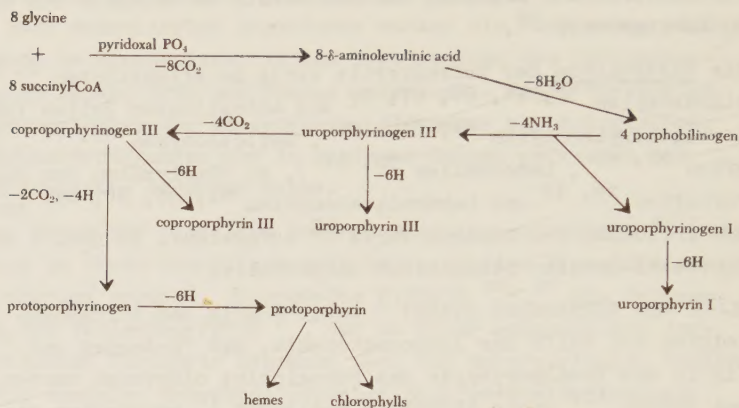
Außer in animalischen Zellen haben FISCHER und Mitarbeiter²⁵ Porphyrine in Vogeleischalen, in den Blättern der Brennnessel, in Hafer, Malz, Kartoffeln, Erbsen, Mais und auch in einigen Hefen sowie in Tuberkelbakterien gefunden²⁶. Unter den mikrobiellen Lebewesen werden Porphyrine sowohl bei den zur Photosynthese befähigten Bakterien als auch bei solchen, die keine Energie aus Licht gewinnen können, nachgewiesen. VAN NIEL¹¹⁶ beobachtete 1944 in der Kulturflüssigkeit vieler photosynthetisierender Bakterien aus der Familie der Athiorhodaceae ein rotes Pigment, das LASCELLES 1956⁵⁴ als ein Gemisch aus Coproporphyrin (zu etwa 95 %) und Uroporphyrin erkannte. Unter den nicht zur Photosynthese befähigten Bakterien fand erstmals PAPPENHEIMER 1947⁸⁴ in der Kulturflüssigkeit von *Corynebacterium diphtheriae* zusammen mit dem Toxin eine Porphyrinanreicherung, wenn der Keim in einem Medium mit niedriger Eisenkonzentration gezüchtet wurde. Es handelte sich, wie spätere Untersuchungen zeigten, um Coproporphyrin

III ⁵⁸. In den unter Eisenmangel wachsenden Kulturen von *C. diphtheriae*, die verstärkt Porphyrine synthetisieren, speichern und an das Kulturmedium abgeben, war der Gehalt an Catalase und Cytochrom b_1 herabgesetzt ⁸⁵.

Die Biosynthese der Tetrapyrrole wurde an pflanzlichen ^{2, 3, 5, 39}, mikrobiellen ^{32, 54, 56, 57, 97} und animalischen Zellen (kernhaltige Vogelerythrocyten ^{31, 61, 100}, Reticulocyten ^{63, 72}, Erythrocyten ^{34, 40}, Leberzellen ^{35, 37}), an Hämolysaten von Hühnererythrocyten ^{16, 18} und Lebermitochondrien ^{41, 95, 96, 115} sowie an dem Protozoon *Tetrahymena vorax* ⁵⁵ aufgeklärt. In Abb. 1 sind die Synthesesequenzen schematisch dargestellt.

BLOCH und RITTENBERG (1945) ¹ sowie SHEMIN und RITTENBERG (1946) ¹⁰¹ zeigten mit Hilfe der Isotopentechnik, daß ²H-Acetat und ¹⁵N-Glycin in das Protoporphyrin des Hämoglobins eingebaut werden. SHEMIN und RUSSEL ¹⁰² sowie NEUBERGER und SCOTT ⁷⁸ entdeckten das erste Intermediärprodukt der Porphyrinbiosynthese, das Aminoketon δ -Aminolävulinsäure (γ -Keto- δ -aminovaleriansäure), welches aus Succinat und Glycin unter gleichzeitiger, wahrscheinlich spontaner Decarboxylierung eines Zwischenproduktes (α -Amino- β -keto adipinsäure) entsteht. Im C-Atom 5 (δ -C) wird ¹⁴C-markierte δ -Aminolävulinsäure, wie Synthesestudien an Hämolysaten aviärer Erythrocyten zeigten, in Protoporphyrin eingebaut ^{15, 78, 103}. Enzymatische Studien an von partikulären Bestandteilen freien Extrakten aus *Rhodospseudomonas sphaeroides* und *Rhodospirillum rubrum* führten zu dem Ergebnis, daß Succinat in Succinyl-Coenzym A überführt wird und dieses "aktive" Succinat mit einer Pyridoxalphosphatverbindung des Glycins kondensiert, wobei sich δ -Aminolävulinsäure und CO₂ bilden ⁴⁹. Die δ -Aminolävulinsäure-Synthetase ist entscheidend an der Regulation der Porphyrinbiosynthese beteiligt. Aus den Untersuchungen von BURNHAM und LASCELLES 1963 ⁸ an ganzen Zellen und Extrakten von *Rhodospseudomonas sphaeroides* geht hervor, daß einer der möglichen Kontrollmechanismen der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase in einer negativen Rückkopplungshemmung durch Häm-in besteht ("negative feedback inhibition": Das Syntheseendprodukt hemmt das Enzym, das den ersten Schritt der für das Endprodukt spezifischen Synthese bewirkt).

Das zweite Intermediärprodukt auf dem Wege zum Porphyrinring, das Monopyrrol Porphobilinogen, wurde 1952 von WESTALL ¹¹⁹ aus dem Urin von Patienten mit akuter Porphyrie isoliert und strukturge-



Scheme 3-1 Pathway of tetrapyrrole synthesis.

Abb. 1: Schematische Darstellung der Synthesesequenzen nach LASCELLES⁵⁹.

misch aufgeklärt. Den Einbau von Porphobilinogen in den Porphyrinring bewiesen FALK, DRESEL, und RIMINGTON 1953²². Die δ -Aminolävulinsäuredehydrase, die zwei Mole δ -Aminolävulinsäure zu einem Mol Porphobilinogen unter Freisetzung von Wasser kondensiert, haben GIBSON, NEUBERGER und SCOTT³² gereinigt und charakterisiert. Das Enzym wurde ebenfalls aus Kaninchenreticulocyten und Hühnererythrocyten⁷² sowie aus Rhodospseudomonas sphaeroides⁸ isoliert. Der Zusatz von Häm vermindert die Aktivität des Enzyms nur gering. Aus vier Molekülen Porphobilinogen entsteht durch zwei verschiedene Enzymfraktionen^{2, 46}, die Porphobilinogendeaminase (= Uroporphyrinogen-I-Synthetase) und Uroporphyrinogenisomerase (= Uroporphyrinogen-III-Cosynthetase) über noch nicht identifizierte, wahrscheinlich zyklisierte Zwischenprodukte von Di- und Poly-Pyrrolmethanverbindungen, Uroporphyrinogen. Das Enzymsystem wurde bei Rhodo-

Pseudomonas sphaeroides ⁷⁹, bei *Chlorella* ⁵ und in Erythrocytenhämolysaten ⁷² gefunden. Bereits 1956 fanden NEVE, LAPBE und ALDRICH ⁷⁹, daß in Erythrocytenhämolysaten nur Uroporphyrinogen, nicht aber Uroporphyrin den Einbau von ⁵⁹-Fe in Häm in fördert. Darauf folgende Untersuchungen von MAUZERALL und GRANICK ⁷² sowie von BOGORAD ² bestätigten, daß die hydrierten Vorstufen der Porphyrine die echte Intermediärstufe der Hämbiosynthese sind.

Uroporphyrinogen-III(I) wird durch die Uroporphyrindecaboxylase zu Coproporphyrinogen schrittweise decarboxyliert, wobei Zwischenprodukte mit 7, 6 und 5 Carboxylgruppen auftreten und die Frage noch offen ist, ob ein oder mehrere Enzyme an der Reaktion, die hinsichtlich der Isomerenreihen stereospezifisch abläuft, beteiligt sind ⁷². Die Bildung von Protoporphyrinogen-III ⁸⁷ erfolgt sauerstoffabhängig durch die Coproporphyrinogenoxydase: Das Enzym, das die Propionsäureseitenketten decarboxyliert und zu Vinylgruppen oxydiert, besitzt eine hohe Substratspezifität für das Isomer III und ist in den Mitochondrien enthalten ⁹⁵. Protoporphyrinogen III wird auch durch langsame Autoxydation, in der Zelle jedoch enzymatisch in Protoporphyrin überführt ⁹⁵.

In der Natur sind bisher Protoporphyrin und Häm der Isomerenreihe I nicht entdeckt worden. Es ist daher anzunehmen, daß Protoporphyrin und Häm biologisch nur in der Isomerenreihe III entstehen. Aus diesem Grunde haben GRANICK und MAUZERALL ⁴⁰ die Bezeichnung Protoporphyrin III anstelle von 9 (Nomenklatur von HANS FISCHER) ²⁶ eingeführt.

Der Einbau von Eisen kann unter physiologischen Bedingungen ⁴⁰ durch Inkubation von Protoporphyrin mit Eisen bei 37° C nicht-enzymatisch vorsichgehen ⁴³. In vivo ist auch der letzte Schritt der Hämsynthese enzymatisch gesteuert. Das eiseninkorporierende Enzym, Ferrochelatase oder Hämsynthetase, wurde zuerst in Mitochondrien der Ratten- ⁵³ und Schweineleber ⁸⁸ und in aviären Erythrocyten ¹²², danach aber auch in Mikroorganismen ⁸⁹ gefunden.

II. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Porphyrinbiosynthese bei Mikroorganismen erhielt durch die Untersuchung der Wachstumsbedürfnisse von *Haemophilus influenzae* einen besonderen Impuls. GRANICK und GILDER³⁸ fanden, daß für das Wachstum von *Haemophilus influenzae* Protohämmin oder Protoporphyrin der physiologischen Isomerenreihe erforderlich ist. Diesem Keim fehlen die zum Protoporphyrin führenden Enzymsysteme. Er verfügt nur über die Hämsynthetase, wie vergleichende Untersuchungen von *Haemophilus*-stämmen, die ausschließlich Hämmin utilisieren, zeigten¹²⁰.

Ausgehend von der Beobachtung, daß *Haemophilus influenzae* mit bestimmten Vertretern der *Diplococcus mucosus*-Gruppe auf häminfreien Nährböden, auf denen kein Satellitenwachstum zusammen mit Staphylokokken stattfindet, Mischkolonien bildet⁶⁵, beschrieb HANITHEIM⁶⁴ einen bakteriellen Hämophiluswuchsfaktor, der, wie mit einem biologischen Nachweisverfahren geprüft wurde, von vielen heterotrophen Bakterien produziert⁶⁶ und in das Kulturmedium abgegeben wird. Auch hierbei handelt es sich um Protoporphyrin und Protohämmin¹⁴, die in Assoziation mit einem Makromolekül, wahrscheinlich einem Lipoprotein, freigesetzt werden und das Wachstum von *Haemophilus influenzae* ermöglichen. Bei Untersuchungen mit Hämolysaten stellte SUGITA¹¹⁰ fest, daß an Proteine gebundenes Protoporphyrin schneller als freies Protoporphyrin in Häm überführt wird.

Verschiedene heterotrophe Bakterien, die cytochrombildenden Spezies¹⁰⁴ angehören, sind zur Tetrapyrrolsynthese fähig. In den Kulturen folgender heterotropher, aerober und fakultativ aerober Bakterienspezies wurden Porphyrine und Protohämmin gefunden⁷⁰: *Rhizobium leguminosarum*, *Achromobacter mucosus*, *Salmonella typhimurium*, *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus subtilis*.

Diese Befunde legten es nahe, an einem mikrobiellen System Regulationsstudien über die Porphyrinsynthese durchzuführen. In einer Untersuchung über die Produktion des *Haemophilus*-X-Faktors durch *Achromobacter metalcaligenes* in definierten Medien fanden sich Hinweise auf starke quantitative Unterschiede in der Bildung freier Porphyrine unter dem Einfluß differenter Substanzen⁶⁸.

Als Tetrapyrrolproduzent wurde *Achromobacter metalcaligenes* ausgewählt. Es stellte sich die Aufgabe, den Einfluß verschiedener Substanzen, von denen einige in ihrer Wirksamkeit auf die Porphyrinsynthese bekannt waren, zu prüfen. Hierbei handelte es sich um 3-Amino-1,2,4-triazol^{45, 69, 111}, Purinderivate^{27, 28, 29}, Riboflavin^{75, 108, 111}, Pyridoxalphosphat^{44, 86} sowie um Inhibitoren, Pharmaka und Chemotherapeutika. Von einigen der Medikamente^{23, 36, 98} wurde ein porphyrinogener Effekt beschrieben, weil sie eine akute Krise bei der intermittierenden Form der hepatischen Porphyrie auslösen können.

In der vorliegenden Untersuchung wurde ausschließlich die Synthese aus δ -Aminolävulinsäure verfolgt. Die Art der Versuchsanordnung erlaubte keine Aussage über Synthesestufen, die der δ -Aminolävulinsäure vorgeschaltet sind.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Mikrobiologischer Teil

a) Testkeim

Als Keim diente Achromobacter metalcaligenes (CASTELLANI and CHALMERS 1919) BERGEY et al. 1925 (cf. STENZEL und MANNHEIM 1963) ¹⁰⁶, und zwar der Stamm Nr. St.661/60 H1H (Hygiene-Institut Heidelberg) Variante K3 (MANNHEIM 1965). Die Kultur wurde auf Trypticase Soy Agar (Baltimore Biological Laboratory) bei Zimmertemperatur gehalten und wöchentlich überimpft.

b) Medien

Für die Inkubationsversuche wurde ein Medium folgender Zusammensetzung verwendet:

Mediumbasis (= stickstoff-freie Basis B) (MANNHEIM und BÜRGER 1966) ⁶⁸:

Natrium-Kaliumphosphatpuffer nach SÖRENSEN

0,067 M, pH 7,0; MgSO_4 $8,1 \times 10^{-4}$ M; NaCl 0,0855 M.

Substratzusätze:

Na-D,L-Lactat 0,025 M; Na-Fumarat 0,025 M; Ferricitrat 10^{-5} M; δ -Aminolävulinsäure (ALA) 2×10^{-3} M.

Das Medium wurde durch Filtration durch SCHOTT G5 in Glasfritten sterilisiert.

c) Produktionssysteme ⁶⁸:

Oberflächenkulturen wurden auf Trypticase Soy Agar in Roux-Flaschen über 14 bis 16 Stunden bei 37° C gezüchtet und die Keime zweimal mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung oder mit M/15 SÖRENSEN Phosphatpuffer, pH 7, abgeschwemmt, zentrifugiert, in Phosphatpuffer gewaschen, in geeigneter Menge resuspendiert und den Inkubationsansätzen zugefügt. Das Gesamtwachstum eines Kulturansatzes und die für die Inkubationsansätze erforderliche Keindichte wurde turbidimetrisch bestimmt. Die Trübungsmessung suspendierter Partikel im MIE-Bereich folgt weitgehend empirischen Regeln ⁷³; für Suspensionen von Bakterien bestimmter Form

und Größe müssen die Beziehungen zwischen optischer Dichte und Trockensubstanz (Zell-C, Protein, DNA etc.) individuell bestimmt werden. Die Abb. 2⁶⁷ zeigt die Beziehung zwischen Transmission (Kulturröhrchen von 13 mm Lumen; Spezialküvettenhalter für zylindrische Gefäße), bei 578 nm gegen das unbeimpfte Medium gemessen, und Trockengewicht für Vertreter dreier in Gestalt und Größe von einander abweichender Spezies. Da die Größe und Lichtbrechung der Bakterienzelle während eines Wachstumszyklus erheblich variierten, sind nur Kulturen des gleichen Wachstumsstadiums untereinander vergleichbar^{74, 121}.

Inkubationen von nichtproliferierenden Keimsuspensionen mit δ -Aminolävulinsäure erfolgten weitgehend unter Rotlicht in mit schwarzem Papier umhüllten Gefäßen.

Jeweils 20 ml Medium wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben (SCHOTT 14) abgefüllt und mit einer turbidimetrisch bestimmten Menge gewaschener Bakterien beimpft. Die Abdeckung der Kölbchen erfolgte mit Stanniolfolie. Die Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, für 24 bis 30 Std. bei 37° C und mäßiger Belüftung inkubiert (in einem horizontal oszillierenden Schüttelapparat, Amplitude 70 mm, Frequenz 60/Min.). Danach wurden Farbe und Intensität der Fluoreszenz unter UV-Licht (355 nm) protokolliert. Ferner erfolgten mikroskopische und kulturelle Sterilitätskontrollen. Die Inkubate wurden bei -25° C eingefroren (einige Tage bis zu einem Monat) und zur weiteren Verarbeitung in der Speedivac-Gefrier-trocknungsanlage (Model 5 PS, EDWARDS HIGH VACUUM LTD) über P₂O₅ bis zu einem Endvakuum von weniger als 20 Mikron Quecksilbersäule lyophilisiert.

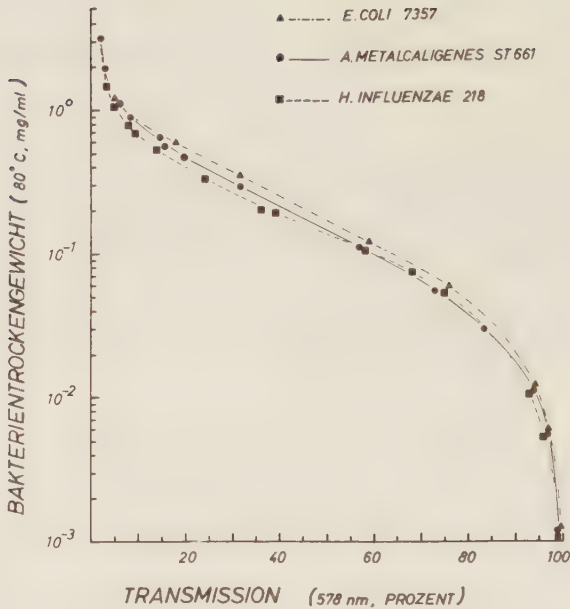


Abb. 2: Beziehung zwischen Transmission (578 nm) und Trockengewicht (80° C) von Bakterien verschiedener Gestalt und Größe in flüssigen Kulturmedien ⁶⁷.

Spezialküvettenhalter Nr. 115320 Zum Fotometer "Eppendorf", zylindrische Kulturgefäße von 13 mm Lumen, gegen das unbeimpfte Medium, zu Beginn der maximal stationären Phase, gemessen.

- ▲ . Escherichia coli, stäbchenförmig, ca 0,8 x 1,2 μ
- . Achromobacter metalcaligenes, kokkoid, ca 1,2 x 1,2 μ
- . Haemophilus influenzae, kleine Kurzstäbchen, ca 0,5 x 0,8 μ

II. Chemischer Teil

Isolierung und Bestimmung der Porphyrine und des Protohämins

(als Methylester (ME)) 10, 13, 14

a) Reagenzien und Lösungsmittel:

Methanol- H_2SO_4 (5 Vol.%; 5 ml konz. H_2SO_4 in 95 ml Methanol p.a. unter Kühlung); Natriumhydrogencarbonat; Natriumsulfat wasserfrei; Benzol; Äthylacetat; Methanol; n-Butanol; Chloroform; Kieselgel H nach Stahl (E. Merck).

Sprühreagenz für die Peroxydasereaktion⁸² (direkt vor Gebrauch herstellen; drei Stunden haltbar): ca 50 mg (2 Spatelspitzen) o-Tolidin (E. Merck AG, Darmstadt) werden in 25 ml Methanol p.a. durch Schütteln in 1 Min. gelöst und der Lösung Aqua dest. 12,5 ml, Eisessig 5 ml, H_2O_2 (3%) 2,5 ml und Pyridin 0,5 ml hinzugefügt. Verwendung unter dem Abzug.

b) Apparate:

Hochvakuumpumpe; Rotationsverdampfer ("ROTAVAPOR" Büchi, Schweiz); Dünnschichtchromatographie (Streichgerät und Schablone zur Plattenbeschichtung von DESAGA, Heidelberg); Chromatographiekammern für Platten, 20x20 cm; UV-Lampe "FIUOTEST FORTE" (355 nm; Quarzlampe-Gesellschaft m.b.H., Hanau); Schichtabsaug- und Elutionsgerät (Fritte G3) nach GOLDRICK und HIRSCH (Abb. 3)³³ (Glastechnische Werkstätten E. Zimmermann, Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Str. 52); KNF Hochleistungs-Membranpumpe (K. Neuberger KG, Freiburg, Breisgau); ZEISS Spektralphotometer PMQ II.

c) Methoden:

1) Veresterung der Porphyrine und des Hämins:

Die lyophilisierten Proben (20 ml) wurden mit je etwa 20 ml Methanol- H_2SO_4 (5 Vol.%) versetzt und 48 Std. bei +4° C gehalten. Unter diesen Bedingungen werden freie Porphyrine zu Porphyrin-ME, Protohäm in zu Häm in-ME quantitativ verestert.

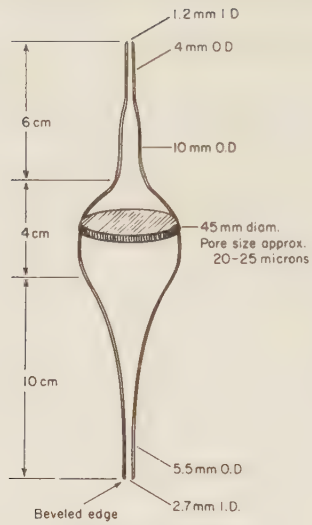


FIG. 2. Dimensions of glass aspirator.

Abb. 3: Schichtabsaug- und Elutionsgerät nach GOLDRICK und
HIRSCH ³³

2) Extraktion der Tetrapyrrolmethylester:

Die veresterte Probe wurde mit der 5-fachen Menge Aqua dest. (ca 100 ml) versetzt und in einem Schütteltrichter fünfmal mit je 10 ml Chloroform kräftig ausgeschüttelt. Bereits nach der ersten Extraktion befinden sich über 90% der Porphyrinmethylester in der Chloroformphase. Die Extraktion ist beendet, wenn die Chloroformphase im UV-Licht keine Rotfluoreszenz mehr zeigt. Dies war in der Regel bei der fünften Extraktion der Fall. Der Chloroformextrakt wurde einmal mit halbgesättigter Natriumbicarbonatlösung und anschließend zwei- bis dreimal mit Aqua dest. gewaschen, bis das pH der Waschphase neutral war. Die Chloroformphase wurde etwa 30 Min. über einigen Spatelspitzen Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration in einen Spitzkolben (25 ml oder 50 ml) erfolgte vollständige Verdampfung des Lösungsmittels unter Vakuum im Umlaufverfahren mit dem Rotationsverdampfer bei 30° C Wassertemperatur. Geringe Mengen an Natriumsulfat adsorbierter Methylester wurden durch mehrmaliges Auswaschen mit Chloroform erfaßt (Prüfung durch Rotfluoreszenz).

3) Dünnschichtchromatographie: 90, 105

Die präparative Dünnschichtchromatographie erfolgte im Prinzip nach der von KLENK und DOSS⁵⁰ angegebenen Technik. Mit Methanol entfettete Glasplatten (20x20 cm) wurden mit Kieselgel H (Körnchengröße 10 bis 40 μ) in Aqua dest. suspendiert, zu einer Schichtdicke von 0,5 mm bestrichen und nach zwei Stunden Lufttrocknung 60 Min. bei 105° C im Wärmeschrank aktiviert. Für die Chromatographie der Porphyrin- und Hämin-ME wurden folgende Lösungsmittelsysteme entwickelt (vgl. Tab. 1):

Lösungsmittelsysteme:

I. Chloroform / Methanol 1 : 1 (v/v) zum Vorlaufen der Kieselgelplatten; Laufstrecke bis an das obere Plattenende. Bei sofort anschließender Verwendung werden sie bei 90° C in 15 Min. getrocknet.

II. Benzol / Äthylacetat / Methanol / Butanol 82 : 14 : 3 : 1 (v/v) für die Trennung von Proto-, Copro- und Uroporphyrin-ME und Hämin-ME sowie zur Rechromatographie von Copro- und Uroporphyrin-ME.

III. Benzol / Äthylacetat / Methanol 85 : 13 : 2 (v/v) für die Trennung der Porphyrin-ME mit 4,5,6,7 und 8 Carboxylgruppen (Abb. 4).

IV. Benzol / Äthylacetat 9 : 1 (v/v) für die Rechromatographie von Protoporphyrin-ME.

V. Chloroform / Äthylacetat 97 : 3 (v/v) für die Rechromatographie von Protoporphyrin-ME.

VI. Chloroform / Methanol 94 : 6 (v/v) für die Isolierung von Hämin-ME.

VII. Benzol / Äthylacetat / Methanol 75 : 15 : 10 (v/v) für die Isolierung von Hämin-ME.



Abb. 4: Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel H) der Porphyrinmethylester nach DOSS ¹⁰.

Lösungsmittelsystem: Benzol/Äthylacetat/Methanol 85:13:2(v/v). Die Porphyrine wurden unter UV-Licht photographiert. Porphyrinmethylester (PME): 1, Meso-P-IX-ME. 2, Deutero-P-IX-ME. 3, Proto-P-IX-ME. 4, Copro-P-III-ME. 5, Pentacarboxyl-P-ME. 6, Hexacarboxyl-P-ME. 7, Heptacarboxyl-P-ME. 8, Uro-P-III-ME. Vgl. Tab. 1.

Tab. 1: R_F -Werte (x 100) der Porphyrin- und Protohämimethylester

Lösungsmittel- system	Temperatur °C	P o r p h y r i n e +						Häm in
B-XA-Bu-M ⁺⁺ (II) 82:14:3:1	20	85	66	52	39	36	34	7
B-XA-M ⁺⁺ (III) 85:13:2	20	75	50	36	26	19	11	3
B-XA (IV) 9:1	20	43	12				0	0
C-XA ⁺⁺ (V) 97:3	20	43	22				17	0
C-M (VI) 94:6	20	Porphyrinmethylester in der Front						45
B-XA-M (VII) 75:15:10	20	98	90				66	35

+ Die Zahlen bedeuten die Anzahl der Carboxylgruppen im Molekül

++ B = Benzol, $\bar{X}A$ = Äthylacetat, M = Methanol, Bu = Butanol, C = Chloroform

Die römischen Ziffern in den Klammern bezeichnen die Nummerierung der Lösungsmittelsysteme im Text (S. 13f). Strecke Start-Front: 10 - 12 cm; Dauer der Entwicklung: 20 - 25 Min.

Die R_F -Werte der einzelnen Substanzen in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen sind in der Tab. 1 zusammengestellt. Es liefen jeweils Testsubstanzen mit: Protoporphyrin-IX-dimethylester, Coproporphyrin-I-tetramethylester, Uroporphyrin-I-oktamethylester (Koch-Light-Laboratories, Colnbrook, England) und Häm-in-ME aus Häm-inchlorid (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz). Die Porphyrine ließen sich durch Rotfluoreszenz im UV-Licht (355 nm) nachweisen.

Abb. 4 zeigt die Auftrennung der Porphyrin-ME im Lösungsmittelsystem III. Häm-in in einer Menge von $>0,5 \mu\text{g}$ ($0,74 \text{ nm}$) war auf der Kieselgel-H-Platte als brauner Flecken oder Streifen sichtbar. Zum qualitativen Nachweis diente das o-Tolidin-Sprühereagenz. Sofort nach Besprühen des Dünnschichtchromatogramms stellte sich die Häm-inzone in dunkelblauer Färbung dar. Mit dem o-Tolidin-Reagenz liegt die unterste Nachweisgrenze bei $0,001 \mu\text{g}$.

A u f t r e n n u n g u n d I s o l i e r u n g

Für präparatives Arbeiten vorgesehene Platten liefen im Lösungsmittelsystem I (S. 13) bis an die obere Plattengrenze, um im Kieselgel vorhandene, in den Lösungsmittelsystemen und mit Chloroform lösliche Verunreinigungen zu eliminieren.

Die am Rotationsverdampfer in Spitzkölbchen eingedampften Tetrapyrrol-ME wurden zur Chromatographie in möglichst wenig Chloroform ($<0,5 \text{ ml}$) wieder gelöst und mit einer Saughütchenpipette (ausgezogenes Glasrohr) auf eine Kieselgelplatte in Form eines dünnen Streifens über die ganze Platte aufgetragen. Mehrmaliges, sorgfältiges Nachspülen mit Chloroform und wiederholtes Auftragen auf die Startzone waren für die quantitative Überführung unerlässlich. Hierbei trat häufig eine Verbreiterung der Startzone ($1,0$ bis $1,5 \text{ cm}$) auf, aus der nach einer Laufstrecke von 2 cm im Lösungsmittelsystem I eine schmale Bande (neuer Startpunkt) entstand. Die Platte wurde mit dem Föhn getrocknet und anschließend im Lösungsmittelsystem II aufsteigend bis zu einer Höhe von 10 bis 12 cm (20 bis 25 Min. , $19 - 21^\circ \text{ C}$) entwickelt. Auf der noch feuchten Platte wurden die R_F -Werte der im UV-Licht rotfluoreszierenden Streifen mit denen der Testsubstanzen vor der Markierung mit dem Skalpell verglichen. Nach dem Trocknen der Platte bei Raumtemperatur wurden die markierten Kieselgelzonen mit dem Spatel abgelöst und in das Schichtabsaug- und Elutionsgerät (Abb. 3) ³³, das an die Wasserstrahl- oder Membranpumpe ange-

geschlossen war, aufgenommen. Die Elution von Proto- und Coproporphyrin-ME erfolgte mit Chloroform, von Uroporphyrin-ME und Hämin-ME mit Chloroform/Methanol 4 : 1 (v/v) unter mildem Druck (Protoporphyrin-ME mit N₂-Strom, die übrigen Substanzen mit Hilfe der Membranpumpe). Nach Abdampfen der Lösungsmittel wurden chromatographisch nicht einheitliche Substanzen in einem Lösungsmittelsystem der Gruppe III bis VII einzeln rechromatographiert.

4) Spektrophotometrische Bestimmung

Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Porphyrin-ME in 2, 5 oder 10 ml Chloroform p.a. gelöst und die Extinktionen am Soret-Maximum gemessen. Bei den mit dem ZEISS-Spektralphotometer PMQ II durchgeführten Bestimmungen wurden pro Einzelanalyse 20 Meßpunkte zwischen 390 und 415 nm eingestellt und aufgezeichnet, um den Verlauf des Soret-Maximums zu beurteilen. Die Berechnung des Porphyringehaltes erfolgte anhand des millimolaren Extinktionskoeffizienten ²⁰ (Tab. 2).

Hämin-ME wurde im Vergleich zu Einwaagen (Eichkurve mit Protohämin-ME) bestimmt.

$$c(\mu\text{M} = 10^{-6}\text{M}) = \frac{E \cdot V_1 \cdot 10^3}{\epsilon_{\text{mM}} \cdot d \cdot V_2}$$

$$\mu\text{g Porphyrin-ME} = \frac{E \cdot \text{Mol.-Gew.} \cdot V_1}{\epsilon_{\text{mM}} \cdot d \cdot V_2}$$

c = Konzentration

E = Extinktion

ϵ_{mM} = millimolarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke

V₁ = Meßvolumen (ml) Chloroform

V₂ = Volumen (ml) des Inkubationsansatzes

Eine spektrophotometrische Analyse der Porphyrine ohne Korrekturfaktoren mußte notwendigerweise auf der Isolierung von Reinsubstanzen basieren ¹³. Die Porphyrinmethylester gelangten zur Auswertung, wenn erstens nach Chromatographie auf Kieselgel ein im UV-Licht rotfluoreszierender Fleck ohne begleitende, andersfarbige Zonen vorhanden war (Abb. 4) und zweitens die Lage der

Tab. 2: Absorptionsmaxima von Proto-, Copro- und Uroporphyrinmethylester
1, bakterielles Produkt. 2, Testsubstanz. 3, Daten nach FALK

Porphyrin- methylester	Lösungsmittel	SORET	IV	III	II	I	ϵ_{mM}	Mol.-Gew.
1 Proto		407	504	539	574	626		
2 Proto-IX	Chloroform	407	504	539	574	626	171	590,66
3 Proto-IX		407	505	541	575	630		
1 Proto		403	502	534	573	629		
2 Proto-IX	Äther	403	502	534	573	629	171	590,66
3 Proto-IX		404	503	536	576	633		
1 Copro		399	498	532	564	623		
2 Copro-I	Chloroform	399	498	532	564	619	180	710,79
3 Copro-I(III)		400	498	532	566	621		
1 Uro		405	500	534	570	624		
2 Uro-I	Chloroform	405	500	534	570	624	215	942,95
3 Uro-I(III)		406	502	536	572	627		

1 und 2 ¹¹ : Spektrophotometer Cary M 15 (vgl. Abb. 5 - 7)

einzelnen Absorptionsmaxima (Tab. 2) und der Kurvenverlauf der Absorptionsminima (Abb. 5, 6, 7) mit den ebenfalls dünn-schicht-chromatographisch gereinigten Vergleichssubstanzen identisch waren ¹³. Auf diese Weise wurden die isolierten chromatographisch einheitlichen Porphyrine und Protohäm in im Vergleich zu authentischen Substanzen identifiziert. Das Absorptionsmaximum von Protohäm in-IX-dimethylester (Mol.-Gew. 680,16), gelöst in Chloroform, lag bei 400 nm (Abb. 8) ¹⁰, der millimolare Extinktionskoeffizient (ϵ_{mM}) betrug 100 ¹¹. Die Abbildungen 5 bis 8 sollen die *q u a l i t a t i v e* Identität der isolierten Substanzen mit bekannten Vergleichssubstanzen (Angabe der Herkunft S. 16 und bei Literatur 13, 14) veranschaulichen. Die zur Registrierung eingesetzten Mengen können aus der für jedes Spektrum angegebenen Extinktion an der SORET-Bande (siehe Abbildungstexte) mit Hilfe der Formeln auf Seite 17 berechnet werden. Die Schichtdicke bei diesen Messungen betrug 1 cm.

Die im Abschnitt B beschriebenen Arbeitsgänge sind auf Abb. 9 schematisch dargestellt.

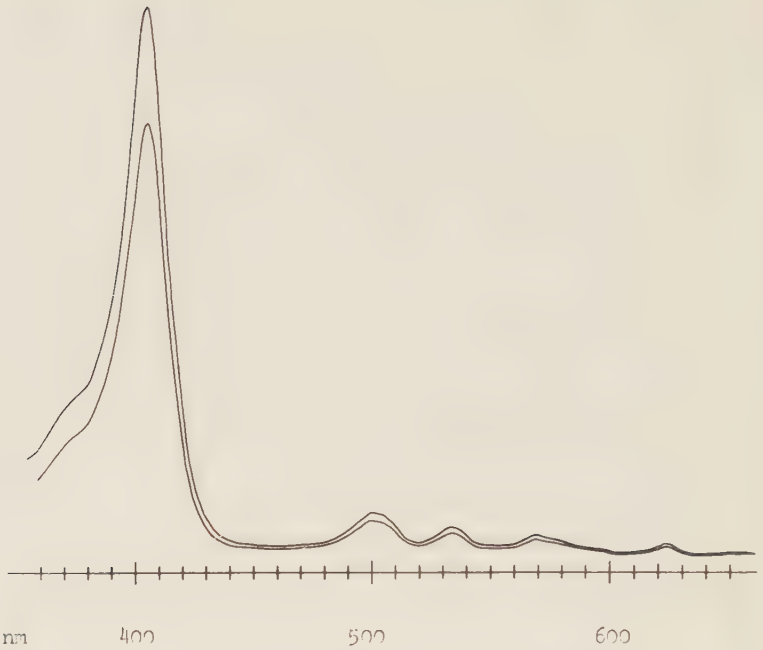


Abb. 5: Absorptionsspektren ¹³ von Uroporphyrin-I-oktamethylester (Vergleichssubstanz, obere Kurve, $E_{405} = 1,58$) und Uroporphyrin-III-oktamethylester ($E_{405} = 1,26$) in Chloroform. Spektrophotometer Cary M 15.

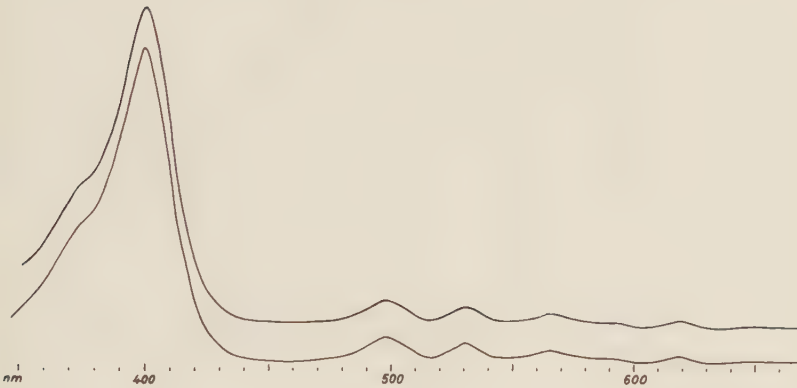


Abb. 6: Absorptionsspektren von Copro-I-tetramethylester (Vergleichssubstanz, obere Kurve, $E_{400} = 0,78$) und Copro-III-tetramethylester von *Achromobacter metalcaligenes* ($E_{400} = 0,77$) in Chloroform ¹¹. Spektrophotometer Cary M 15.

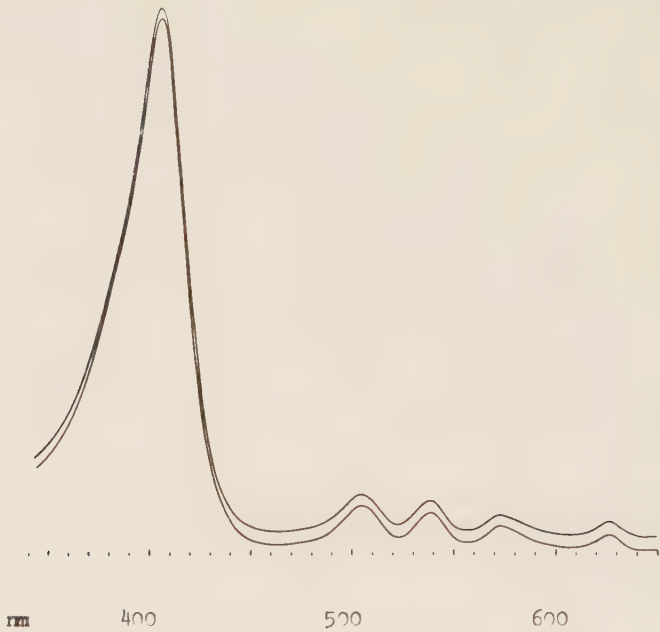


Abb. 7: Absorptionsspektrum von Protoporphyrin-IX-dimethylester (Vergleichssubstanz, obere Kurve, $E_{407} = 1,76$) und Protoporphyrindimethylester aus *Achromobacter metalcaligenes* ($E_{407} = 1,66$) in Chloroform ⁷⁰. Spektrophotometer Cary M 15.

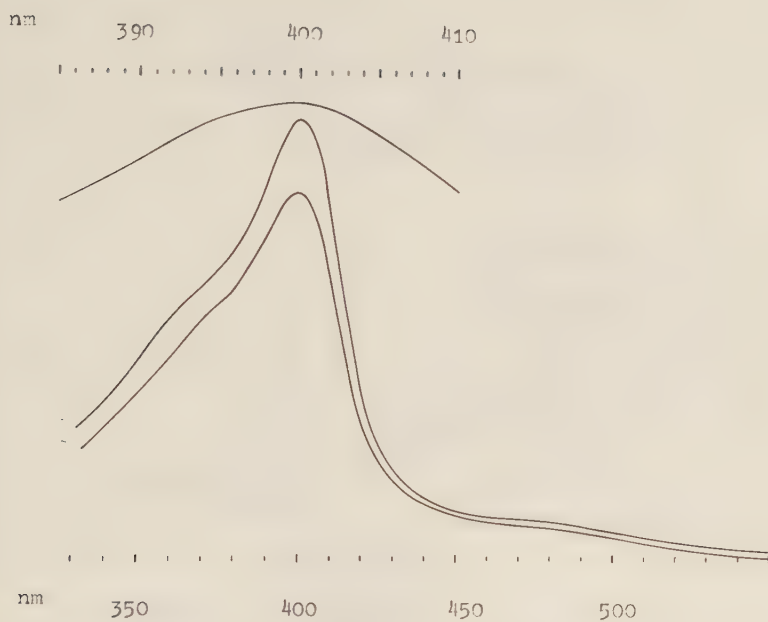


Abb. 8: Absorptionsspektrum von Protohämmin-ME (nach DOSS ¹⁰) in Chloroform. 1, Hämmin-ME, gewonnen von *Achromobacter metalcaligenes* ($E_{400} = 0,95$). 2, Test-Hämmin-ME ($E_{400} = 0,78$). Spektrophotometer Cary M 15.

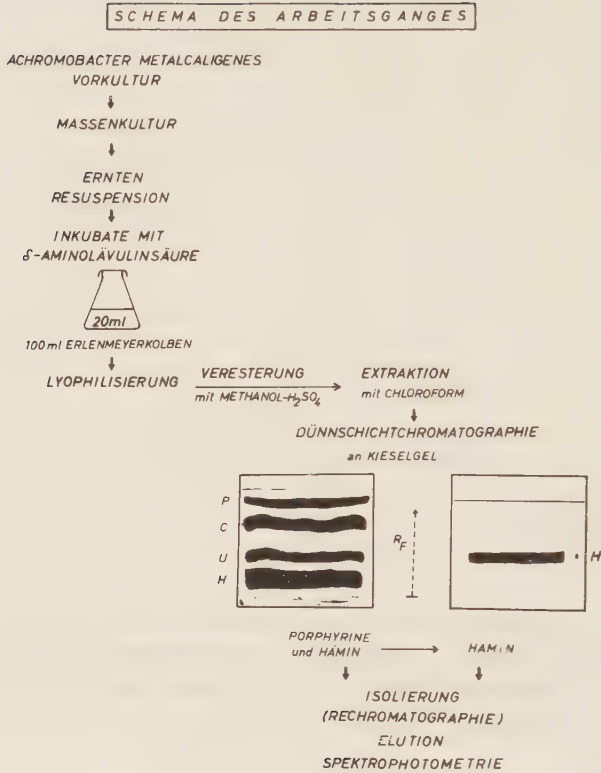


Abb. 9: Schematische Darstellung des experimentellen Teils.

d) Prüfung der Richtigkeit der Methode

Die Richtigkeit der Methode wurde durch Wiederauffindungsversuche und statistische Prüfungen ermittelt.

Bekannte Mengen von Protoporphyrin-ME, Uroporphyrin-ME und Protohämin-ME wurden dem Methanol- H_2SO_4 -Gemisch zugesetzt und in Chloroform extrahiert, chromatographiert, eluiert und gemessen (Tab. 3).

Außerdem erfolgte eine quantitative Überprüfung der präparativen Dünnschichtchromatographie. Die Höhe der wiedergefundenen Porphyrin- und Hämin-ME ist aus Tab. 4 ersichtlich. Der gegenüber den anderen Substanzen größere Verlust von Protoporphyrin-ME bei der Dünnschichtchromatographie ist wahrscheinlich auf eine artefizielle Zerstörung durch Benzol²⁰ zurückzuführen. In Chloroform/Methanol 1 : 1 (v/v) vorgelaufene Kieselgel-H-Platten waren bei derselben Aufarbeitung spektrophotometrisch leerwertfrei.

Um die Genauigkeit der Methode zu ermitteln, wurden die üblichen statistischen Prüfmittel angewandt. Die Standardabweichung wurde berechnet nach den Formeln:

$$Q = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n}$$

$$s^2 = \frac{Q}{n-1}$$

$$s = \sqrt{s^2}$$

Darin bedeuten:

Q = Summe der quadratischen Abweichung

n = Anzahl der Messungen

x_i = Einzelmessung

s^2 = Varianz

$\bar{x}$ = Mittelwert aus den Einzelbestimmungen

Die Fehlerbreite der Analysen geht aus Tab. 3 und 4 hervor. Als relatives Maß für die Streuung wurde der Variationskoeffizient

(VK) nach PEARSON (prozentualer Anteil der Standardabweichung am arithmetischen Mittel) bestimmt ⁵¹.

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

VK liegt unter den angegebenen Arbeitsbedingungen für Mengen über 2,5 µg zwischen 1,4 und 7,5 %.

e) Einfluß von Zeit und Temperatur auf die Veresterung

Es wurde der Einfluß der Zeit und Temperatur auf die Veresterung von Di- und Oktacarboxyporphyrinen geprüft. Da sich die Veresterung von Porphyrinen mit weniger als acht Carboxylgruppen schneller als die des Uroporphyrins vollzieht, gewährt eine Versuchsanordnung für die vollständige Veresterung des Uroporphyrins ebenfalls die quantitative Umsetzung der 3- bis 7-Carboxyporphyrine. Aus Tab. 5 geht hervor, daß der Einfluß von Zeit und Temperatur unter den angegebenen Bedingungen auf die Veresterung gering war. Die Ausbeute der Protoporphyrinmethylester war allerdings in den bei Zimmertemperatur veresterten Ansätzen um 18 % verringert. Porphyrine, insbesondere Protoporphyrin, sind instabil gegen Licht in sauren Lösungen und organischen Lösungsmitteln. Eine stärkere artefizielle Zerstörung der Vinylseitenketten der Porphyrine während der Veresterung bei Zimmertemperatur ist nicht ausgeschlossen. FALK ²⁰ berichtete über die vollständige Veresterung von Protoporphyrin nach 18 Std. bei -10° C. Um sämtliche Porphyrine und Hämin in einem Arbeitsgang quantitativ in Methylester zu überführen, haben wir die Veresterung bei +4° C über 48 Std. durchgeführt. Die gefundenen Unterschiede in temperatur- und zeitabhängigem Verhältnis der Ausbeuten von Protohämin-ME und Uroporphyrin-ME lagen im Bereich der Fehlerbreite.

f) Vergleichende Ausbeutebestimmung an intakten und desintegrierten Zellen

Die Porphyrin- und Häminausbeuten von intakten Zellen wurden mit denen desintegrierter Zellen verglichen, um zu prüfen, ob die Veresterung in lyophilisierten, ganzen Bakterien und die Extraktion quantitativ vonstatten gehen (Tab. 6).

Die Desintegration erfolgte mit einem Schüttelhomogenisator (Modell MSK der Fa. BRAUN, Apparatebau, Melsungen), unter Kühlung mit flüssigem CO_2 , wobei die Zellwände durch Schütteln gegen Glasperlen (Durchmesser 0,17 - 0,18 mm) bei einer Frequenz von 4000/Min. und Temperatur zwischen 0 und 10°C zerstört wurden.

In der Natur sind Porphyrine durch ihre Carboxylgruppen an Albumin und Globulin, Protohäm in durch das Eisen an Globulin gebunden. Es handelt sich aber in beiden Fällen nicht um eine hetero- oder homöopolare chemische Bindung, sodaß durch Einwirkung von Methanol- H_2SO_4 (5Vol%) auf das biologische Material die darin enthaltenen Porphyrine sowie das im Hämoglobin und Cytochrom b als prosthetische Gruppe fungierende Häm in die Methylester überführt werden. Die prosthetische Gruppe von Cytochrom c wird unter diesen Bedingungen nicht angegriffen (Thioätherbindung). Tab. 6 zeigt, daß die Protohämwerte bei intakten Zellen gegenüber desintegrierten Zellen um etwa 10 % erhöht waren. Die unterschiedlichen Meßwerte der Porphyrine lagen innerhalb der Fehlergrenze.

Tab. 3: Rückgewinnungsversuche für Proto(P)-, Uro(U)-Porphyrin-ME und Protohäm(H)-ME nach Extraktion und präparativer Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel H.

ME	Eingesetzte Menge (μg) ($\bar{y}$)	Wiedergefundene Menge				$\frac{\bar{x}}{\bar{y}}$ in %
		$(\bar{x} \pm 2s; n=4)$	$\bar{x} + 2s$	$\bar{x} - 2s$		
U	6,25	$5,82 \pm 0,75$	6,57	5,07		93,2
P	7,02	$4,73 \pm 0,47$	5,20	4,26		67,3
P ⁺	7,02	$6,22 \pm 0,03$	6,25	6,19		88,7
H	24,13	$22,05 \pm 2,18$	24,23	19,87		91,4

$\bar{x}, \bar{y}$ = Mittelwerte

s = Standardabweichung

n = Anzahl der Versuche

P⁺ = Rückgewinnung nach Extraktion

Tab. 4: Rückgewinnungsversuche für Proto(P)-, Copro(C)-, Uro(U)-Porphyrin-ME und Protohäm(in)(H)-ME nach präparativer Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel H.

ME	Eingesetzte Menge (μg) ($\bar{y}$)	Wiedergefundene Menge			in %
		($\bar{x} \pm 2s; n=4$)	$\bar{x} + 2s$	$\bar{x} - 2s$	
P	2,04	1,45 $\pm$ 0,36	1,81	1,09	70,8
	2,07	1,40 $\pm$ 0,11	1,51	1,29	67,6
	12,34	9,71 $\pm$ 1,05	10,76	8,66	78,7
C	1,38	1,25 $\pm$ 0,66	1,91	0,59	90,7
	2,50	2,34 $\pm$ 0,35	2,69	1,99	93,3
	3,84	3,81 $\pm$ 0,15	3,96	3,66	99,1
U	1,58	1,56 $\pm$ 0,14	1,70	1,42	98,7
	3,18	3,08 $\pm$ 0,09	3,17	2,99	97,0
H	20,34	19,94 $\pm$ 1,16	21,10	18,78	98,1

$\bar{x}$, $\bar{y}$ = Mittelwerte, s = Standardabweichung, n = Anzahl der Versuche

Tab. 5: Einfluß von Zeit und Temperatur auf die Veresterung von Proto(P)-, Uro(U)-porphyrin und Protohämin(H) zu Methylestern(ME). Mengen in μg .

ME	20°C, 24 Std.		40°C, 48 Std.		Verhältnis der Ausbeuten
	$\bar{x} \pm 2s; n=4$	VK	$\bar{x} \pm 2s; n=4$	VK	
P	$0,637 \pm 0,086$	6,74	$0,778 \pm 0,047$	3,04	$\frac{P_{20^{\circ}, 24^h}}{P_{40^{\circ}, 48^h}} = 81,9$
H	$1,105 \pm 0,144$	6,50	$1,066 \pm 0,111$	5,22	$\frac{H_{40^{\circ}, 48^h}}{H_{20^{\circ}, 24^h}} = 96,4$
U	$0,057 \pm 0,009$	7,90	$0,054 \pm 0,000$	0,00	$\frac{U_{40^{\circ}, 48^h}}{U_{20^{\circ}, 24^h}} = 95,2$

$\bar{x}$ = Mittelwerte

s = Standardabweichung

n = Anzahl der Versuche

VK = Variationskoeffizient

Tab. 6: Vergleichende Ausbeutebestimmung an intakten und desintegrierten Zellen bei Proto(P)-Porphyrin-ME und Protohäm(in(H))-ME. Mengen in μg .

ME	DESINTEGRIERTE ZELLEN		INTAKTE ZELLEN		Verhältnis der Ausbeuten
	$\bar{x} \pm 2s; n=4$	VK	$\bar{x} \pm 2s; n=4$	VK	
P	$0,627 \pm 0,067$	5,34	$0,637 \pm 0,062$	4,87	$\frac{P_d}{P_i} = 98,4$
H	$0,958 \pm 0,029$	1,51	$1,066 \pm 0,111$	5,22	$\frac{H_d}{H_i} = 89,9$

$\bar{x}$ = Mittelwerte

s = Standardabweichung

n = Anzahl der Versuche

VK = Variationskoeffizient

g) Isomerenanalyse von Copro- und Uroporphyrin

Copro- und Uroporphyrin wurden in die Isomerenreihen I und III differenziert ¹³.

Uroporphyrin-Isomere:

Die Uroporphyrin-Isomere wurden als Methylester auf Papier (Whatman Nr. 1 oder Schleicher und Schüll 2043b) mit der Dioxan-Methode nach FALK und BENSON ²¹ getrennt. Das Chromatogramm wurde im System Kerosen/Dioxan 4 : 1 (v/v) auf Papierstreifen 18 x 11 cm entwickelt. Uroporphyrin-III-oktamethylester (Testsubstanz und Isolierung aus porphyrischem Urin) wanderte 2,5 bis 3,0 cm und setzte sich klar und ohne Streifenbildung ab. Bei Uroporphyrin-I-oktamethylester (Testsubstanz und Präparat aus Aerobiern) ¹³ beobachtet man dagegen häufig eine streifige Ausziehung der am Startpunkt liegengebliebenen Substanz. Zur Auswertung unter UV-Licht wurden die Chromatogramme 10 Min. bei 105° C getrocknet.

Coproporphyrin-Isomere

Die Trennung der Coproporphyrin-Isomere erfolgte in der aufsteigenden Chromatographie der freien Säuren auf Papier nach ERIKSEN ¹⁹. Die Porphyrin-ME wurden in 25%iger HCl gelöst; die Hydrolyse war nach 48 Std. bei Zimmertemperatur vollständig. Nachdem die Lösung mit NaOH und Natriumacetat auf pH 4 gebracht worden war, erfolgte die Extraktion der freien Säuren in Äther; der Extrakt wurde mit Aqua dest. neutral gewaschen, über einer kleinen Menge Natriumsulfat (ca 2 Spatelspitzen) getrocknet, filtriert und eingedampft. Die freien Coproporphyrine wurden in einem Lösungsmittelgemisch von konzentrierter Ammoniaklösung/Wasser/Aceton 1 : 2 : 7 (v/v) auf Papierstreifen (Schleicher und Schüll 2043b) 18 x 11 cm aufgetragen und im System 2,6 Lutidin/Wasser 5 : 2 (v/v) entwickelt. Die atmosphärische Sättigung bewirkte ein zylindrisches Glas mit konz. NH_4OH , das auf dem Boden des Chromatographiegefäßes stand. Coproporphyrin-III-ME war die schneller wandernde Substanz.

C. ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

Den in Abb. 13 - 27 dargestellten Ergebnissen lagen folgende VERSUCHSBEDINGUNGEN zugrunde:

MEDIUM: Stickstoff-freie Mediumbasis F und Substratzusätze (vgl. S. 8)

SUSPENSIONSDICHTE: ca 0,6 - 0,9 mg Bakterientrockengewicht/ml.

INKUBATION: Ansätze von je 20 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben; 22 - 26 Std. bei 37° C mit mäßiger Belüftung (Schüttelfrequenz 60/Min., Amplitude 70 mm).

MESSERGEBNIS: In den Abb. 15 - 27 sind die Werte der Porphyrin- und Häminalysen in Prozent der Kontrollwerte der Versuchsreihen (VR) graphisch dargestellt. Die Kontrollwerte wurden in Tab. 7 auf Seite 34 zusammengefaßt.

Die Zahlen unter den Substanzen in den Abbildungen 15 - 27 geben, wenn keine nähere Bezeichnung aufgeführt ist, deren Molarität (M) an.

Tab. 7: K o n t r o l l e n zu den Versuchsansätzen.
Meßwerte in μM .

Nummer der Versuchsreihe	U	C	P	H
I	1,553	0,017	0,071	0,250
II	0,512	0,089	0,213	0,795
III	0,194	0,173	0,029	0,446
IV	0,262	0,046	0,074	0,430
V	0,185	0,181	0,019	0,155
VI	0,143	0,050	0,043	0,512

Messungen der Porphyrine und des Hämins als Methylester (ME) in Chloroform am Soret-Maximum. U = Uroporphyrin-ME (S-Bande bei 405 nm); C = Coproporphyrin-ME (S-Bande bei 399 nm); P = Protoporphyrin-ME (S-Bande bei 407 nm); Protohämin-ME (S-Bande bei 400 nm). Kleinstes Meßvolumen 2 ml; d = 2 cm. Spektrophotometer Zeiss PMQ II.

Die Unterschiede der Analysenwerte der einzelnen Versuchsreihen (VR) sind auf verschiedene Einsaatdichte, verschieden lange Inkubationszeiten (bis Rotfluoreszenz im UV-Licht (Anregungswellenlänge bei 355 nm) der Inkubate nachweisbar wurde) und nicht experimentell kontrollierte Faktoren des biologischen Systems zurückzuführen.

I. Verteilung der Porphyrine zwischen Zellen und Medium

Die Verteilung der Porphyrine und des Protohäm zwischen Zellen und Überstand ist aus Tab. 8 ersichtlich. Coproporphyrin und Uroporphyrin befinden sich zum überwiegenden Teil im Überstand, während Protoporphyrin und vor allem Protohäm vorwiegend in den Zellen nachweisbar sind. Unter Zusatz von δ -Aminolävulinsäure läuft eine sehr starke Synthese, besonders der unteren Porphyrinstufen, ab. Die in großer Menge auftretenden Syntheseprodukte mit vier bis acht Carboxylgruppen werden von der Zelle ins Medium abgegeben.

Tab. 8: Verteilung der Porphyrine und des Protohäm (μ M) zwischen Zellen und Überstand in einer ALA-Kultur von *Achromobacter metalcaligenes*.

	U	C	P	H	P+H
Zellen	0,059	< 0,003	0,702	1,068	1,770
Überstand (100ml; 38 000 x g)	0,303	0,286	0,269	0,069	0,338
Gesamtkultur	0,362	0,286 + < 0,003	0,971	1,137	2,108
Prozentualer Anteil im Überstand	83,7	> 99,0	27,4	6,2	13,2

Medium: N-freie Basis B und Substratzusätze (s. S. 8), Inkubation bei 35° C über 26 Std. im Schüttelinkubator. Wuchsdichte der Kultur (865 ml): 1 mg/ml Bakterientrockengewicht. Außer den analysierten Porphyrinen waren auf dem Chromatogramm kleinere Mengen von 3-, 5-, 6- und 7-Carboxyporphyrinen unter dem UV-Licht (355 nm) sichtbar.

Abkürzungen: ALA = δ -Aminolävulinsäure, U = Uro-, C = Copro-, P = Protoporphyrinmethylester. H = Protohäm methylester.

II. Einfluß der Belüftung auf die Porphyrinsynthese

Für diesen Versuch wurde folgende Anordnung verwendet: Kulturvolumina von 10, 20, 30, 40, 50 und 60 ml wurden jeweils viermal in 100 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und im Schüttelinkubator bei einer Frequenz von 60/Min. und einer Amplitude von 70 mm geschüttelt. Die Kölbchen waren lediglich mit Stanniolpapier bedeckt, sodaß ein Gasaustausch stattfinden konnte.

Aus Tab. 9 sowie den Abbildungen 10 und 11 geht hervor, daß unter den gegebenen Voraussetzungen optimale Bedingungen für die Tetrapyrrolsynthese bei 30 ml Kulturvolumen bestanden. Das bedeutet, daß eine mittelstarke Belüftung die Porphyrinbildung aus δ -Aminolävulinsäure am stärksten fördert.

Eine starke Belüftung (10 ml Kulturvolumen) ermöglichte noch eine relativ gute Synthese, während die niedrigsten Ausbeuten bei schwacher Belüftung (60 ml Kulturvolumen) gemessen wurden. Die Untersuchungen zeigen, daß besonders für die letzten Schritte der Synthese Sauerstoff erforderlich ist. Die Bildung von Protoporphyrin durch die Coproporphyrinogenoxydase ist sauerstoffabhängig und partikulär gebunden ⁹⁵.

Tab. 2: Einfluß der Belüftung auf Proto(P)-, Copro(C)-, Uro(U)-Porphyrin-III- und Protohämin(H)-ME. Angaben in μM . Mittelwert aus 4 Ansätzen.

Kulturvolumen (ml) in 100 ml- Erlenmeyerkolben	U	C	P	H	Wuchsdichte der Kultur bei der Ernte (mg Trockengewicht/ml)
10	0,045	0,031	0,032	0,553	0,88
20	0,066	0,035	0,037	0,638	0,72
30	0,037	0,052	0,055	1,000	0,78
40	0,035	0,030	0,038	0,465	0,76
50	0,027	0,029	0,011	0,274	0,64
60	0,024	0,021	0,011	0,228	0,43

Einsatz 0,75 $\mu\text{g/ml}$ aus einer 20-stündigen Vorkultur im Ammonium-Lactat-Fumarat
- δ -Aminolävulin säuremedium.

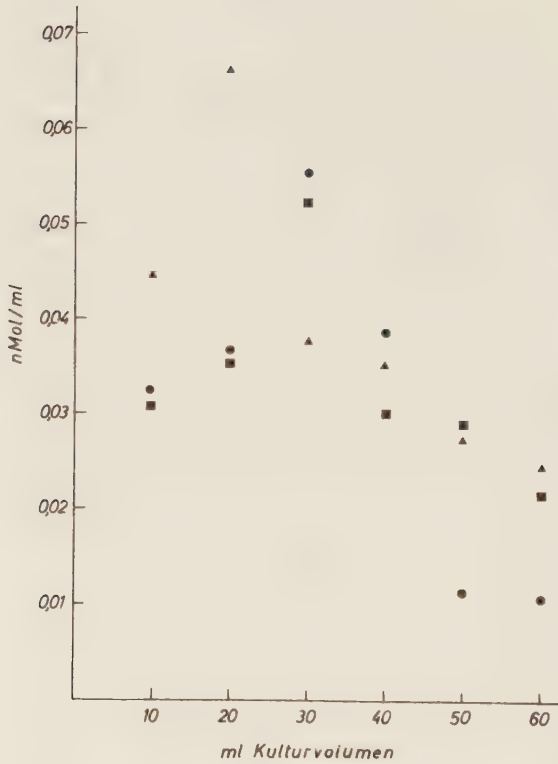


Abb. 10: Einfluß der Belüftung auf Proto-, Copro- und Uroporphyrinbiosynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*.

- = Proto-P-ME
- = Copro-P-ME
- ▲ = Uro-P-ME

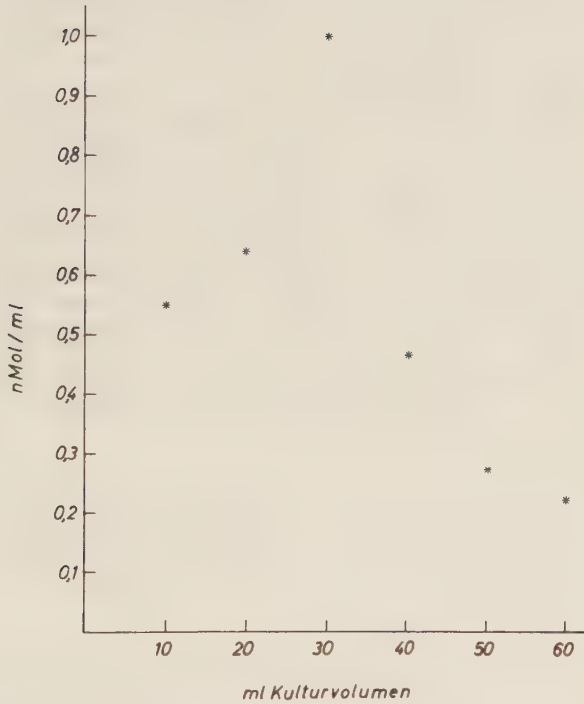


Abb. 11: Einfluß der Belüftung auf die Häm(bio)synthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*.

* = Häm(bio)synthese

III. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Tetrapyrrolsynthese

a) Riboflavin und 3-Amino-1,2,4-triazol

Aminotriazol (AT) und Riboflavin haben einen komplexen, im einzelnen noch nicht aufgeklärten Wirkungsmechanismus auf die Porphyrinsynthese. Der Einfluß von AT ist vorwiegend fördernd, besonders nach Zusatz von Riboflavin.

Bei *Tetrahymena vorax* bleibt die Fähigkeit, Porphyrine aus δ -Aminolävulinsäure zu bilden, erhalten, selbst wenn Pyridoxin oder Pantothenäure fehlen, sie geht aber verloren, wenn Riboflavin fehlt⁵⁸. Nach Zugabe des Vitamin-B₂-Komplexes zum Medium einer Kultur von *Saccharomyces anamensis* fand STICP¹⁰⁸ eine Förderung der Häm synthese um das 10- bis 15-fache; deshalb lag die Vermutung nahe, daß Riboflavin in die Eisenverwertung eingreift, da viel Protophäm, aber wenig Protoporphyrin gebildet wurde.

Wie an Tierversuchen festgestellt wurde, bewirkt 3-Amino-1,2,4-triazol (AT) ein Absinken der Katalase-Aktivität in Leber und Niere⁴⁵.

Aminotriazol, als Herbizid an Baumwollpflanzen eingesetzt, führte zu Blattverlust und Wachstumshemmung; die Chlorophyllsynthese wurde gestört⁴⁵. AT wirkt allerdings nur dann inhibitorisch, wenn Peroxyd bei der Reaktion vorhanden ist (Katalase-Peroxyd I - Komplex)^{80, 113}.

SUND und Mitarbeiter beobachteten die Toxizität von AT an Tomatenpflanzen¹¹¹. Hier ruft AT eine Hemmung des Wachstums und der Chlorophyllsynthese hervor. Die Wachstumshemmung konnte durch Purinkörper wie Adenin, Guanin und Hypoxanthin, wie auch durch Adenosin, Guanosin und Inosin reduziert werden. Ebenfalls ließ sich der negative Einfluß von AT auf Wachstum und Chlorophyllsynthese durch Riboflavin, Flavinmononucleotid und Flavinadenindinucleotid abschwächen. Diese Ergebnisse weisen auf mögliche Zusammenhänge zwischen dem Purinstoffwechsel und Aminotriazol einerseits sowie AT und der Tetrapyrrolsynthese andererseits hin. Diese Zusammenhänge lassen sich weiterhin aufgrund der Strukturähnlichkeit von AT und Pyrrolen vermuten. Die Untersuchungen von BOGORAD² sprachen dafür, daß durch eine AT-Konzentration bis 5×10^{-3} M keine Störung der Porphyrinsynthese aus Porphobilinogen stattfindet.

Experimente in diesem Laboratorium brachten Hinweise darauf, daß AT die Synthese von Dicarboxy-Porphyrinen aus δ -Aminolävulinsäure steigert ^{67, 69} (Abb. 12). Diese Frage wurde in folgendem Versuch bearbeitet: Sowohl AT allein als auch in Kombination mit Riboflavin in Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-5} M wurde den statischen Kulturen zugesetzt. Die Analysenergebnisse (Abb. 13, 14) zeigen, daß Aminotriazol bei einer Konzentration von ca 10^{-4} M die Bildung sämtlicher Porphyrine und des Häm aus δ -Aminolävulinsäure fördert. Zusatz von Riboflavin führt zu einer weiteren Steigerung der Synthese über den AT-Effekt hinaus.

Eine Erklärung des Wirkungsmechanismus kann aufgrund dieser Ergebnisse allein nicht gegeben werden. Die Befunde sprechen jedoch dafür, daß ein Angriff an der Verwertung der δ -Aminolävulinsäure, also sehr wahrscheinlich eine Wirkung auf die δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase, vorhanden sein muß. Offen bleibt besonders die Frage, ob sich die Wirkung auf eine Aktivierung oder Neubildung von Enzymen erstreckt.

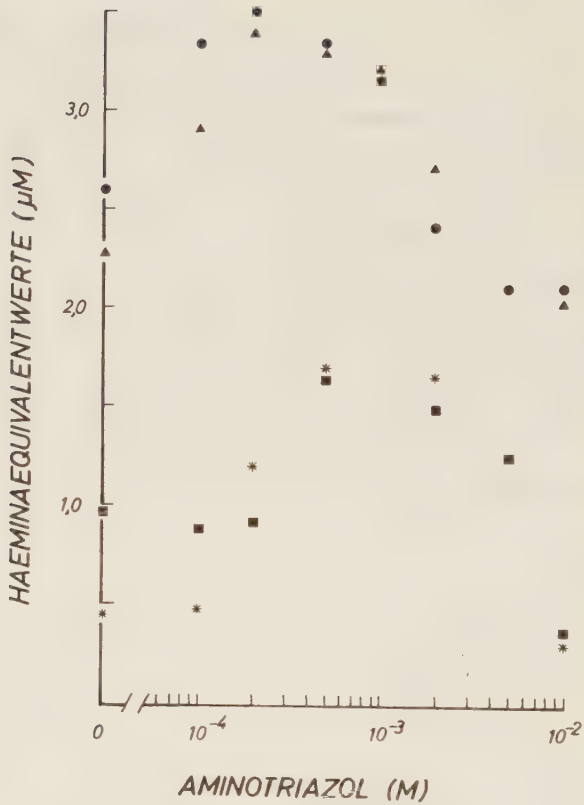


Abb. 12: Einfluß von 3-Amino-1,2,4-triazol, Riboflavin und Kombinationen auf die *Mimophilus*-X-Faktorproduktion durch *Achromobacter metalcaligenes* ⁶⁷.

- = Ansatz I
 - * = Ansatz II
 - = Ansatz I
 - ▲ = Ansatz II
- } ohne Riboflavin
- } mit Riboflavin 10⁻⁴ M



Abb. 13: Einfluß von Riboflavin und Aminotriazol (AT) auf die Uro- und Coproporphyrinbiosynthese aus δ -Aminolävulin-säure bei *Achromobacter metalcaligenes*

- = Copro-P-ME Riboflavin
- = Uro-P-ME Riboflavin
- = Copro-P-ME AT
- = Uro-P-ME AT
- △ = Copro-P-ME Riboflavin + AT
- ▲ = Uro-P-ME Riboflavin + AT
- * = Copro-P-ME Kontrolle
- ⊙ = Uro-P-ME Kontrolle

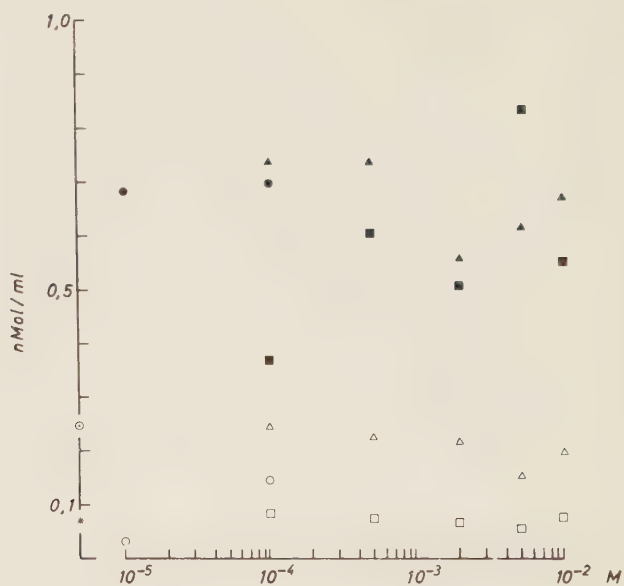


Abb. 14: Einfluß von Riboflavin und Aminotriazol (AT) auf die Protoporphyrin- und Protophäm biosynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

- = Proto-P-ME Riboflavin
- = Hämin-ME Riboflavin
- = Proto-P-ME AT
- = Hämin-ME AT
- △ = Proto-P-ME Riboflavin + AT
- ▲ = Hämin-ME Riboflavin + AT
- * = Proto-P-ME Kontrolle
- ⊙ = Hämin-ME Kontrolle

b) Der Einfluß von Purinderivaten auf die Porphyrinsynthese

GAJDOS und GAJDOS-TORÖK^{27, 28, 29} haben in ihren Studien über den Effekt von Adeninnucleosiden und Adeninnucleotiden auf die Porphyrinsynthese bei *Rhodopseudomonas sphaeroides* gezeigt, daß Inosin, Adenosin-monophosphat, Adenosin-di-phosphat und Adenosin-tri-phosphat die Porphyrinsynthese hemmen. Der Hemmeffekt von Adenosin-mono-phosphat²⁹ in Konzentrationen von 3×10^{-3} und 3×10^{-4} M wurde zur therapeutischen Anwendung dieser Substanz bei der congenitalen erythropoetischen Porphyrie genutzt⁶⁰.

Der stärkste Hemmstoff dieser Substanzklasse ist ATP²⁸. GAJDOS und Mitarbeiter haben jedoch keinen Einfluß von Purinderivaten auf die Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure festgestellt.

Untersuchungen in diesem Laboratorium zeigten (MANNHEIM und DOSS)⁶⁹, daß sich die Wirkung von Adenosin auch auf spätere Stadien der Porphyrinsynthese erstreckt und im Falle des Uroporphyrins zu einer absoluten Erhöhung der Porphyrinproduktion führt. Dieser Befund wurde auch durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt (Abb. 15). Die Bildung von Coproporphyrin, Protoporphyrin und Protohämmin wird dagegen durch Adenosin gehemmt (Abb. 15). Insgesamt zeigten die Purinderivate Adenin, Inosin, Adenosin (Abb. 15), Adenosin-mono-phosphat und Adenosin-tri-phosphat (Abb. 16) jedoch eine inhibitorische Tendenz auf die Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß der Wirkungsmechanismus von Purinderivaten auch bei der Verwertung angebotener δ -Aminolävulinsäure und ihrer Folgeprodukte angreift.



Abb. 15: Einfluß von ADENIN (3×10^{-3} M; VR II), ADENOSIN (3×10^{-3} , 3×10^{-4} M; VR II) und INOSIN (3×10^{-3} M; VR II) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

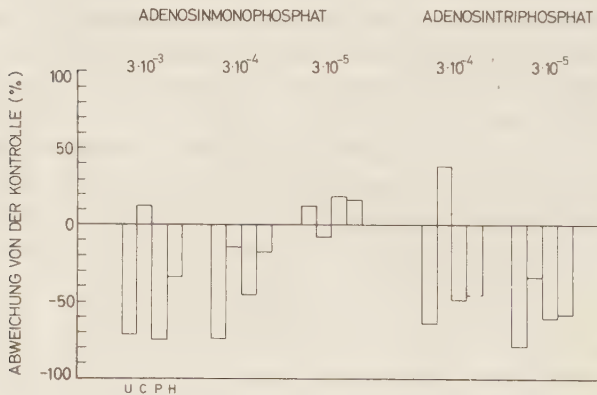


Abb. 16: Einfluß von ADENOSINMONOPHOSPHAT (3×10^{-3} , 3×10^{-4} , 3×10^{-5} M; VR II) und ADENOSINTRIPHOSPHAT (3×10^{-4} , 3×10^{-5} M; VR II) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

Abkürzungen: VR = Versuchsreihe (Tab. 7)

U C P H: vgl. Seite 35

c) Einfluß von Vitamin B₆

Pyridoxal-5-phosphat stellt ein essentielles Coenzym für den ersten Schritt der Tetrapyrrolsynthese, die Bildung von δ -Aminolävulinsäure, dar ^{31, 49, 55, 61}. Vitamin B₆ führt bei pyridoxinsensiblen Anämien zu einer Aktivierung der Häm-synthese, insbesondere zu einer erstaunlichen Bildung von Protoporphyrin aus δ -Aminolävulinsäure ⁴⁴ und damit zu einer Aktivierung der Häm-synthese. Deshalb lag es nahe, den Einfluß von Pyridoxal-5-phosphat, Pyridoxal-Hydrochlorid und Pyridoxin in unserem mikrobiellen System zu prüfen. In allen Versuchen zeigte sich bei den Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} M eine erhebliche Steigerung der Uro- und Coproporphyrinsynthese (Abb. 17). Diese Befunde sind am ehesten dahingehend zu deuten, daß die Substanzen des Vitamin B₆ die Decarboxylierungsprozesse im Porphyrinstoffwechsel fördern. Ausgehend von dieser Arbeitshypothese haben PETRES und Mitarbeiter ⁸⁶ Pyridoxal-5-phosphat mit Erfolg bei der Behandlung der Porphyria cutanea tarda angewandt.

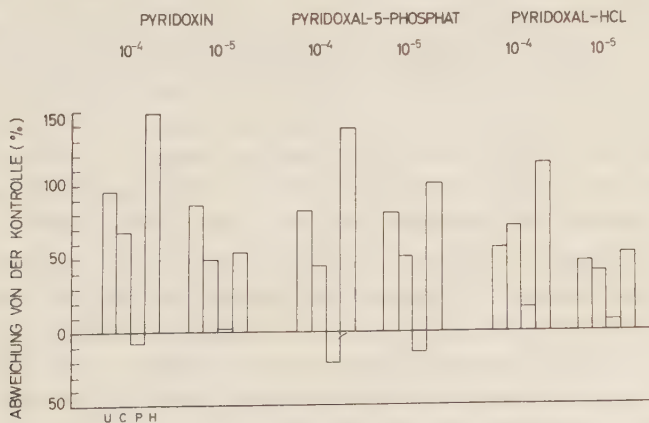


Abb. 17: Einfluß von PYRIDOXIN (10^{-4} , 10^{-5} M; VR V), PYRIDOXAL-5-PHOSPHAT (10^{-4} , 10^{-5} M; VR V) und PYRIDOXAL-HCL (10^{-4} , 10^{-5} M; VR V) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

Abkürzungen: VR = Versuchsreihe (Tab. 7)

U C P H: vgl. Seite 35

d) Einfluß von Inhibitoren und Schwermetallen

Es wurde eine Reihe von Stoffen untersucht, von denen zum größten Teil bekannt ist, daß sie eine Wirkung auf die Porphyrinsynthese ausüben. Es sind aber auch einige Substanzen geprüft worden, deren Einfluß auf die Tetrapyrrolsynthese erst in den vorhergehenden Versuchen erkannt worden war.

2,4-Dinitrophenol, das bei intakten Hämmererythrocyten ¹⁷ zu einer vollständigen Hemmung der Protoporphyrinsynthese (fehlende Kondensation von Succinyl-Coenzym A und Glycin) führt und als Entkoppler der Atmungskettenphosphorylierung bekannt ist, bewirkte in den Konzentrationen zwischen 10^{-5} und 10^{-7} M eine starke Hemmung der Porphyrinsynthese des Testkeims (Abb. 18). Kaliumcyanid (Abb. 19), das, wie GIBSON, LAVER und NEUBERGER ³¹ feststellten, ebenfalls die ersten Syntheseschritte inhibiert, zeigte eine ähnliche Wirkung wie 2,4-Dinitrophenol, während Natriumazid (Abb. 20) in den Konzentrationen 5×10^{-4} , 5×10^{-5} und 10^{-7} M einen für die Bildung der einzelnen Tetrapyrrole zwar unterschiedlichen, in der Gesamttenenz aber ebenfalls hemmenden Effekt ergab. Natriumacetat (2×10^{-2} und 10^{-2} M), Indol-3-Essigsäure (10^{-4} M), Jodessigsäure (10^{-4} M) (Abb. 21) sowie Schwermetallverbindungen (Abb. 22) greifen an mehreren Stufen der Porphyrinsynthese an. Diese Stoffe sind als Inhibitoren der δ -Aminolävulinsäuresynthetase und -dehydratase sowie der Uroporphyrinogensynthetase bekannt. Die vorliegenden Versuche bestätigten den hemmenden Einfluß dieser Substanzen auf die gesamte Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure.

Die inhibitorische Wirkung von Malonat (Abb. 23) wurde von GRANICK ³⁴ beschrieben. Die kompetitive Hemmung der Succinodehydrogenase durch Malonat kommt für unsere Versuchsanordnung, bei der δ -Aminolävulinsäure zugesetzt wird, nicht in Frage. Ebenso entfällt eine Wirkung, wie sie für das Aminomalonat beschrieben wird ⁷¹. Es ist jedoch festzustellen, daß Malonat auch einen negativen Einfluß auf die Synthese von Protoporphyrin und Protohäm aus δ -Aminolävulinsäure hat.

Malat (2×10^{-2} und 10^{-2} M) und Maleat (10^{-2} und 10^{-3} M), von denen eine Hemmwirkung auf die ersten Syntheseschritte beschrieben wurde ⁴¹, lassen bei *Achromobacter metalcaligenes* eine vorwiegend hemmende Wirkung auf die Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure erkennen (Abb. 23). Natrium-Kalium-Tartrat (2×10^{-2} M)

(Abb. 23) fördert die Bildung von Uro- und Coproporphyrin, während es die Synthese von Protoporphyrin unterdrückt. Seine Wirkung ist mit der von Malonat vergleichbar.

Die geprüften Schwermetallverbindungen p-Chlormercuribenzoat, Bleiacetat, Arsenit und Thalliumacetat (Abb. 22) übten außer Bleiacetat in einer Konzentration von 0,1 %, eine starke inhibitorische Wirkung auf die Porphyrinsynthese aus. p-Chlormercuribenzoat (10^{-4} und 10^{-7} M) und Thalliumacetat (0,1 %) waren die stärksten Inhibitoren dieser Gruppe. p-Chlormercuribenzoat blockierte die Porphyrinsynthese in fast allen Synthesestufen nahezu vollständig ^{31, 40, 48, 54, 62}. Da es auch auf spätere Syntheseschritte einwirkt ⁴⁴, war in unserem System bei Zusatz von δ -Aminolävulinsäure ein negativer Einfluß zu erwarten. Chlormercuribenzoat wirkte als eine der wenigen Substanzen bakterizid. Thalliumacetat bewies eine deutliche Schädigung des Keimes in der Vermehrungsfähigkeit.

Arsenit (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M) zeigte eine vorwiegend hemmende Tendenz. Gleiche Ergebnisse fanden GRANICK ³⁴, LOCKWOOD und BENSON ⁶² und GRANICK und URATA ⁴¹.

Bei Bleiacetat (0,05 %, 0,1 %) war die Tendenz uneinheitlich, ebenso wie das Ergebnis zweier verschiedener Untersuchungen an Bleiarbeitern ^{9, 118}.

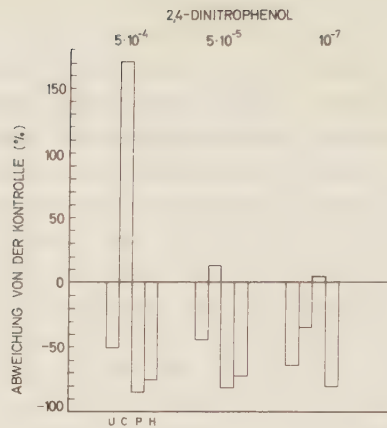


Abb. 18: Einfluß von 2,4-DINITROPHENOL (5×10^{-4} , 5×10^{-5} M; VR IV und 10^{-7} M; VR III) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

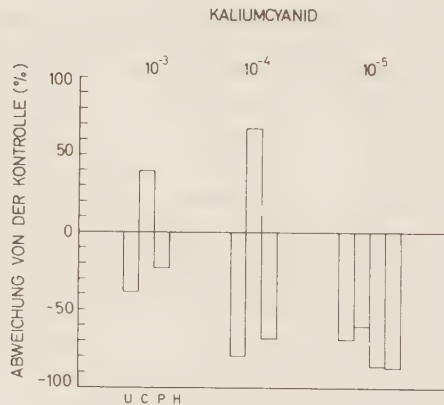


Abb. 19: Einfluß von KALIUMCYANID (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M; VR IV) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

Abkürzungen: VR = Versuchsreihe (Tab. 7)

U C P H: vgl. S. 35

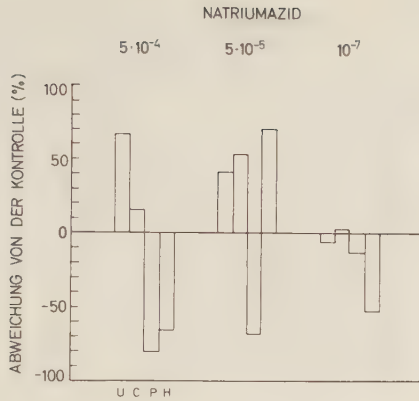


Abb. 20: Einfluß von NATRIUMAZID (5×10^{-4} , 5×10^{-5} M; VR IV und 10^{-7} M; VR III) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

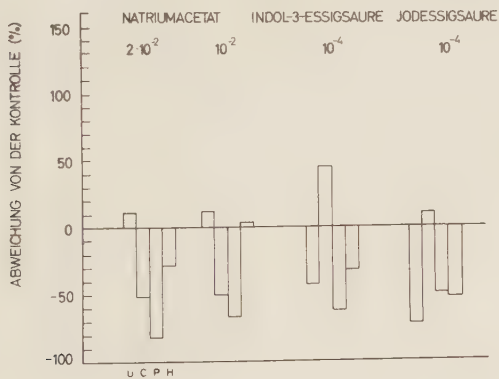


Abb. 21: Einfluß von Natriumacetat (2×10^{-2} , 10^{-2} M; VR IV), INDOL-3-ESSIGSÄURE (10^{-4} M; VR II) und JODESSIGSÄURE (10^{-4} M; VR II) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

Abkürzungen: VR = Versuchsreihe (Tab. 7)

U C P H: vgl. Seite 35

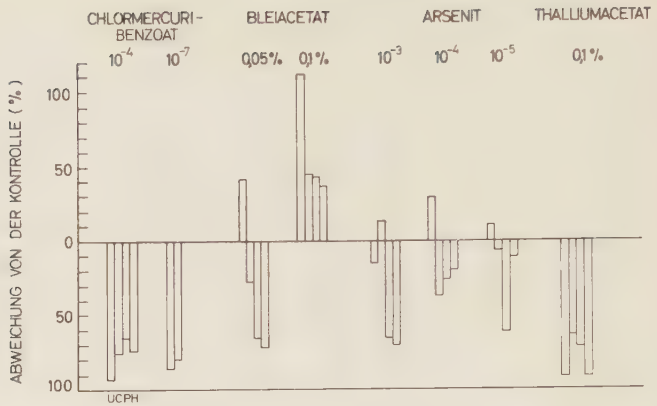


Abb. 22: Einfluß von PARA-CHLORMERCURIENZOAT (10^{-4} M; VR V und 10^{-7} M; VR III), BLEIACETAT (0,05 %, 0,1 %; VR IV), ARSENIT (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M; VR IV) und THALLIUMACETAT (0,1 %; VR IV) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulininsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

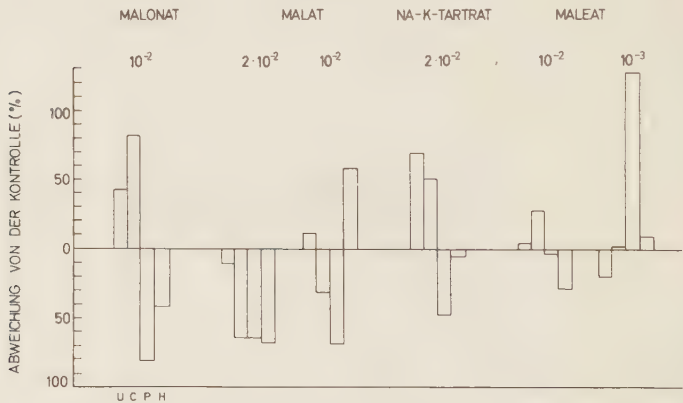


Abb. 23: Einfluß von MALONAT (10^{-2} M; VR IV), MALAT (2×10^{-2} , 10^{-2} M; VR IV), NA-K-TARTRAT (2×10^{-2} M; VR IV) und MALEAT (10^{-2} , 10^{-3} M; VR V) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulininsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

Abkürzungen: VR = Versuchsreihe (Tab. 7)

U C P H: vgl. Seite 35

e) Einfluß von Pharmaka und Chemotherapeutika

Bei der nächsten Gruppe der untersuchten Substanzen handelt es sich um Pharmaka, deren porphyrinogene Wirkung auf den animalischen Organismus schon lange bekannt ist. Bereits im Jahre 1895 berichtete STOKVIS¹⁰⁹ über eine durch Sulfonal verursachte Porphyrurie bei Kaninchen und Hunden. SCHMID und SCHWARTZ⁹⁹ konnten 1952 mit Sedormid eine Porphyrurie bei Kaninchen auslösen. OCKNER und SCHMID⁸¹ berichteten 1961 über eine toxische Porphyrurie bei Menschen und Ratten durch Hexachlorbenzol. Außer Sedormid ist inzwischen eine Anzahl von Barbitursäurepräparaten als porphyriererzeugend erkannt worden (FRUGSCH⁷, REMINGTON⁹² 1964, REMINGTON⁹³ 1966, STICH¹⁰⁷).

Meine Versuche betrafen Di-Allyl-Barbitursäure und 5-Allyl-5-isopropyl-Barbitursäure (Abb. 24). Die Ergebnisse zeigten kein einheitliches Bild. Di-Allyl-Barbitursäure bewirkte in einer Konzentration von 10^{-4} M vorwiegend eine Hemmung, dagegen in einer Konzentration von 10^{-7} M eine Steigerung der Porphyrinsynthese. Resochin[®] (7-Chlor-4-(4'-diäthylamino-1'-methylbutylamino)-chinolindiphosphat), das nach den klinischen Beobachtungen von SWEENEY¹¹² am Menschen eine erhöhte renale Ausscheidung von δ -Aminolävulinsäure, Porphobilinogen, Uro- und Coproporphyrin hervorrufen kann, bewirkte eine verminderte Syntheseleistung (Abb. 24). Mit Hexachlorbenzol (10^{-7} M) (Abb. 24) konnte nur ein sehr geringer Einfluß auf die Porphyrinsynthese bei *Achromobacter metalcaligenes* im Sinne einer Hemmung ausgeübt werden. In Tierversuchen jedoch hat sich Hexachlorbenzol als porphyrinogene Substanz erwiesen^{81, 94, 98}.

Die Chemotherapeutika Durenat[®] (2-Sulfanilamido-5-methoxydiazin), Streptomycinsulfat und Griseofulvin bewirkten eine intensive Hemmung der Tetrapyrrolsynthese, nur bei Chloramphenicol wurde in einer Konzentration von 5 mg % eine Mehrsynthese von Uroporphyrin gemessen (Abb. 25). Die angewandte Streptomycinsulfatkonzentration war bakterizid. Sulfonamide, Chloramphenicol und Griseofulvin^{83, 91} sind als porphyrie-auslösende Substanzen bekannt und wurden deshalb zur Untersuchung eingesetzt. Die Unwirksamkeit von Griseofulvin gegen Bakterien⁵² macht die inhibitorische Wirkung auf *Achromobacter metalcaligenes* verständlich.

Überraschenderweise fand sich in den Inkubationsansätzen, denen Anti-PPLO-Agens (Tylosintartrat, Fa. Grand Island Biological Co.) zugesetzt wurde, eine extrem hohe Uroporphyrinbildung (Abb. 26). Es handelt sich um ein Präparat, das zur Behandlung der Pleuropneumonie bei Rindern und der Agalaktie bei Ziegen, hervorgerufen durch Mycoplasmen (PPLO = "Pleuro-Pneumonia Like Organisms"), angewandt wird. Wie die Kontrollaussaat zeigte, handelte es sich um bakterizide Konzentrationen.

Etacrynsäure (2,3-Dichlor-4-(2-Methylenbutyryl)-phenoxy-Essigsäure = Hydromedin [®], freundlicherweise von der Fa. Sharp und Dohme zur Verfügung gestellt), die in den letzten Jahren als Diuretikum in die medizinische Therapie eingeführt wurde, hatte in verschiedenen Konzentrationen (0,1 mg %, 0,01 mg %, 0,001 mg %, 0,0001 mg %) einen fördernden Einfluß auf die Porphyrinsynthese (Abb. 27). Ein porphyrinogener Effekt von Etacrynsäure scheint in der Humanmedizin bisher noch nicht beobachtet worden zu sein. Die Wirkung der Substanz bei *Achromobacter metalcaligenes* kann vorläufig nicht erklärt werden.

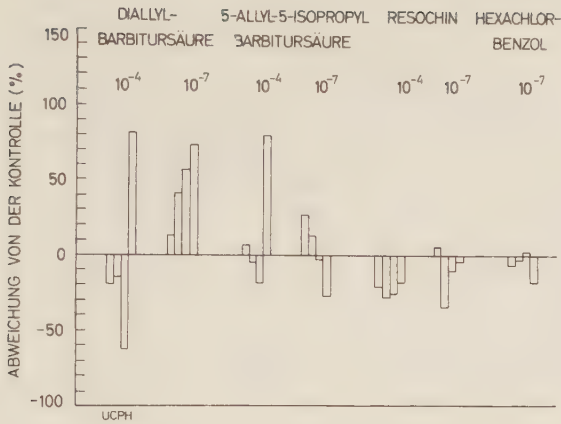


Abb. 24: Einfluß von DIALLYLBARBITURSÄURE (10^{-4} M; VR V und 10^{-7} M; VR III), 5-ALLYL-5-ISOPROPYLBARBITURSÄURE (10^{-4} M; VR V und 10^{-7} M; VR III), RESOCHIN[®] (10^{-4} M; VR V und 10^{-7} M; VR III) und HEXACHLORBENZOL (10^{-7} M; VR III) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

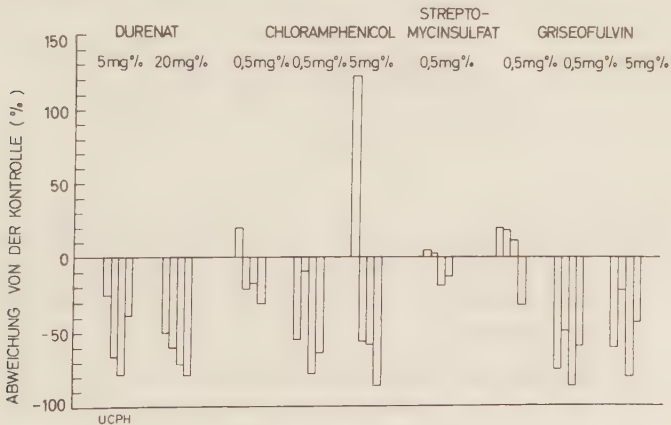


Abb. 25: Einfluß von DURENAT[®] (2-Sulfanilamido-5-methoxydiazin) (5 mg %, 20 mg %; VR IV), CHLORAMPHENICOL (0,5 mg %; VR III und 0,5 mg %, 5 mg %; VR IV), STREPTOMYCINSULFAT (0,5 mg %; VR III) und GRISEOFULVIN (0,5 mg %; VR III und 0,5 mg %, 5 mg %; VR IV) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

Abkürzungen: VR = Versuchsreihe (Tab. 7)

U C P H: vgl. Seite 35



Abb. 26: Einfluß von ANTI PPLO AGENTS (Tylosintartrat) (1 : 100; VR III und 1 : 100, 1 : 50; VR IV) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

Abkürzungen: VR = Versuchsreihe (Tab. 7)

U C P H vgl. Seite 35

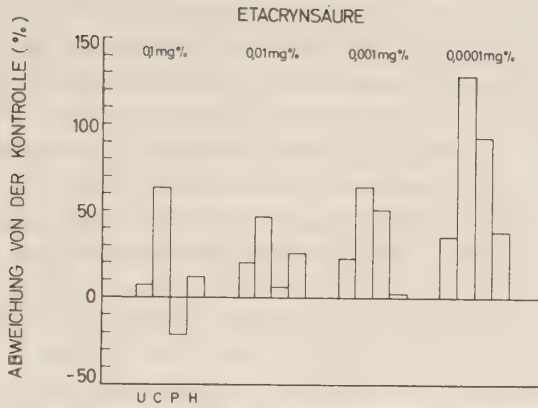


Abb. 27: Einfluß von ETACRYNSÄURE (2,3-Dichlor-4-(2-Methylenbutyryl)-phenoxy-Essigsäure = Hydromedin[®]) (0,1 mg %, 0,01 mg %, 0,001 mg %, 0,0001 mg %; VR IV) auf die Tetrapyrrolsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*

Abkürzungen: VR = Versuchsreihe (Tab. 7)

U C P H: vgl. Seite 35

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach einer historischen Übersicht über Vorkommen und Biosynthese zyklischer Tetrapyrrole wird auf noch offene Probleme bei der Regulation der Porphyrinbiosynthese hingewiesen und daraus die Fragestellung der vorliegenden Arbeit abgeleitet.
2. Das mikrobielle System bestand aus gewaschenen, in einem definierten Medium resuspendierten Zellen von *Achromobacter metalcaligenes*, die auf Trypticase-Soy-Agar kultiviert worden waren. Die Syntheseveruche mit δ -Aminolävulininsäure erfolgten mit statischen Kulturen, die durchschnittlich über 24 Stunden bei 37° C unter mäßiger Belüftung inkubiert wurden.
3. Die zur Isolierung und Bestimmung der Porphyrine und des Protophämins angewandten Verfahren werden näher beschrieben. Die methodischen Schritte sind folgende: Lyophilisierung des biologischen Materials, Veresterung der Porphyrine und des Protophämins im gefriergetrockneten Material mit Methanol-Schwefelsäure zu Methylestern, Extraktion der Ester mit Chloroform, Chromatographie der Tetrapyrrol-Methylester auf Kieselgel-H-Dünnschichtplatten, Elution und spektrophotometrische Messung am Soret-Maximum. Das chromatographische Verhalten der Porphyrin-Methylester in verschiedenen Lösungsmittelsystemen wird angegeben. Die chromatographischen Methoden eignen sich zur Isolierung von Reinsubstanzen.
4. Eigene Untersuchungen zur Methodik beziehen sich auf den Einfluß von Zeit und Temperatur auf die Veresterung sowie auf vergleichende Ausbeutebestimmungen an intakten und desintegrierten Zellen. Die Exaktheit und Reproduzierbarkeit der methodischen Ergebnisse werden anhand von Wiederauffindungsversuchen und statistischen Prüfmitteln ermittelt. Der Variationskoeffizient als Maß für die Standardabweichung der Einzelbestimmung liegt zwischen 3 und 8 %.
5. Protoporphyrin und Protophämin befinden sich zu etwa 80 % in den Zellen, während Copro- und Uroporphyrin zum überwiegenden Teil an das Medium abgegeben werden.

6. 3-Amino-1,2,4-Triazol und Riboflavin fördern unter den angegebenen Versuchsbedingungen die Syntheserate sämtlicher Porphyrine und des Hämin. Der Wirkungsmechanismus ist unbekannt.
7. Vitamin B₆ in seiner aktiven Form (Pyridoxal-5-phosphat), Pyridoxal-Hydrochlorid und Pyridoxin führen zu einer erhöhten Ausbeute von Uro- und Coproporphyrin sowie von Protohämin. Die Wirkung dieser Substanzen besteht wahrscheinlich in einer Aktivierung der Decarboxylierungsprozesse.
8. 2,4-Dinitrophenol, Kaliumcyanid, Natriumazid, Natriumacetat, Indol-3-Essigsäure, Jod-Essigsäure, Malonat, Malat und Maleat sowie die Schwermetallverbindungen Chlormercuribenzoat, Arsenit und Thalliumacetat sind als Inhibitoren der Tetrapyrrolsynthese bekannt und bewirken auch bei dem gewählten Testkeim einen vorwiegend hemmenden Effekt auf die Synthese aus δ -Aminolävulinsäure. Bleiacetat ist in verschiedenen Konzentrationen von wechselndem Einfluß.
9. Von den geprüften Pharmaka und Chemotherapeutika hemmen Resochin, Hexachlorbenzol, Durenat, Chloramphenicol, Streptomycinsulfat und Griseofulvin überwiegend die Porphyrin- und Häminsynthese. Di-Allyl-Barbitursäure und 5-Allyl-5-isopropyl-Barbitursäure sind in den Konzentrationen 10^{-4} und 10^{-7} M von unterschiedlichem Einfluß. Das Anti-PPLO-Agens (Tylosintartrat) fördert intensiv die Uroporphyrinsynthese. Bemerkenswert ist die Wirkung von Etacrynsäure, die noch eingehender untersucht werden sollte.
10. Die Ergebnisse zeigen, daß sich auch mikrobielle Systeme für Studien über die Regulation der Tetrapyrrolsynthese eignen. Der Frage, ob es möglich ist, an einem geeigneten mikrobiellen System Pharmaka mit einer für die animalische Zelle vergleichbaren Wirkung auf die Porphyrinsynthese zu untersuchen, sollte weitere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

E. LITERATUR

1. BLOCH, K. a. D. RITTENBERG: An estimation of acetic acid formation in the rat. J. Biol. Chem. 159 (1945) 45-58.
2. BOGORAD, L.: The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. I. Uroporphyrin I. J. Biol. Chem. 233 (1958) 501-509.
3. BOGORAD, L.: The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. II. Uroporphyrin III. J. Biol. Chem. 233 (1958), 510-515.
4. BOGORAD, L.: The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. III. Uroporphyrinogens as intermediates. J. Biol. Chem. 233 (1958) 516-519.
5. BOGORAD, L. a. S. GRANICK: The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 39 (1953) 1176-1188.
6. BORST, M. u. H. KÖNIGSDOERFFER: Untersuchungen über Porphyrie mit besonderer Berücksichtigung der Porphyria congenita. S. Hirzel, Leipzig, 1929.
7. BRUGSCH, J.: Porphyrine, Johann Ambrosius Barth Verlag Leipzig, 1959.
8. BURNHAM, B. F. a. J. LASCELLES: Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feedback mechanism. Biochem. J. 87 (1963) 462-472.
9. CRAMÉR, K.: Predisposing factors for lead poisoning. Acta Med. Scand., Suppl. 445, 1966, S. 56-59.
10. DOSS, M.: The quantitative separation of porphyrins and protohemin as methylesters by thin-layer-chromatographie. J. Chromatogr. 30 (1967) 265-269.
11. DOSS, M.: Unveröffentlicht.
12. DOSS, M. u. F. FÜRGER: Über die Isolierung und Charakterisierung von Hämato porphyrin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 936-938.

13. DOSS, M. u. W. MANNHEIM: Dünnschichtchromatographische Methode zur Isolierung und Bestimmung der Porphyrine im Urin. Z.klin.Chem.u.klin.Biochem, 5(1967)260-264.
14. DOSS, M. u. W. MANNHEIM: Protoporphyrin und Hämin in Kulturfiltraten von *Achromobacter metalcaligenes*. *Experientia* (Basel) 23(1967)31-33.
15. DRESEL, E. I. B. a. J. E. FALK: Conversion of δ -aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. *Nature*, London, 172(1953)1185-1185.
16. DRESEL, E. I. B. a. J. E. FALK: Studies on the biosynthesis of blood pigments. 1. Haem synthesis in haemolyzed erythrocytes of chicken blood. *Biochem.J.* 56(1954)156-163.
17. DRESEL, E. I. B. a. J. E. FALK: Haem and porphyrin formation in intact chicken erythrocytes. *Biochem.J.* 63(1956)72-79.
18. DRESEL, E. I. B. a. J. E. FALK: Studies on the biosynthesis of blood pigments. 3. Haem and porphyrin formation from δ -aminolaevulinic acid and from porphobilinogen in haemolyzed chicken erythrocytes. *Biochem.J.* 63(1956)80-87.
19. ERIKSEN, L.: *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 10(1958)319, zit. nach J.E.FALK (20), S. 194.
20. FALK, J.E.: *Porphyryns and Metalloporphyryns*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1964.
21. FALK, J.E. a. A.BENSON: Separation of uroporphyrin esters I and III by paper chromatography. *Biochem.J.* 55(1953)101-104.
22. FALK, J.E., E.I.B.DRESEL a. C.RIMINGTON: Porphobilinogen as a precursor, and interconversion of porphyryns, in a tissue system. *Nature*, London, 172(1953)292-294.
23. FILIPPINI, L.: Die Therapie der akut intermittierenden Porphyrie. *Dtsch.med.Wschr.* 91(1966)959-961.
24. FISCHER, H., H.HILMER, F.LINDNER u. B.PÜTZER: Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine. XVIII.Mitteilung. Chemische Befunde bei einem Fall von Porphyrinurie (Petty). *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 150(1925)44-101.

25. FISCHER, H.u.F.KÖGL: Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine.
IV. Über das Ooporphyrin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.131
(1923)241-261.
IX. Über Ooporphyrin aus Kiebitzeierschalen und seine Beziehungen zum Blutfarbstoff. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.138(1924)262-275.
FISCHER, H.u.F.LINDNER: XIV: Über Ooporphyrin und seine Überführung in den Ester des Hämins. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.142(1925)141-154.
26. FISCHER, H.u.H.ORTH: Die Chemie des Pyrrols. Bd.II/1, S. 158-618. Akad.Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1937.
27. GAJDOS, A.a.M.GAJDOS-TORÖK: The inhibitory effect of purine nucleosides and nucleotides on the porphyrin syntheses by Rhodopseudomonas sphaeroides. South Afr.J.Lab.Clin.Med.9
(1963)232-234.
28. GAJDOS, A.a.M.GAJDOS-TORÖK: Mechanism of the inhibitory effect of adenine nucleotides on porphyrin synthesis by Rhodopseudomonas sphaeroides. Nature, London, 207(1965)640-641.
29. GAJDOS, A., M.GAJDOS-TORÖK, A.PALMA-CARLOS a.L.PALMA-CARLOS: Porphyria induced in rats by orotic acid and the effect of adenine-5-monophosphoric acid. Nature, London, 211(1966) 974-975.
30. GIBSON, K.D.: Biosynthesis of δ -aminolaevulinic acid by extracts of Rhodopseudomonas sphaeroides. Biochim.biophys. Acta, 28(1958)451.
31. GIBSON, K.D., W.G.LAVER a.A.NEUBERGER: Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 2. The formation of δ -aminolaevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. Biochem.J. 70(1958)71-81.
32. GIBSON, K.D., A.NEUBERGER a.J.J.SCOTT: The purification and properties of δ -aminolaevulinic acid dehydrase. Biochem.J. 61(1955)618-629.
33. GOLDRICK, B.a.J.HIRSCH: A technique for quantitative recovery of lipids from chromatoplates. J.Lipid.Res. 4(1963)482-485.

34. GRANICK, S.: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes.
I. Formation of δ -aminolaevulinic acid in erythrocytes. J.Biol. Chem. 232(1958)1101-1117.
35. GRANICK, S.: Induction of the synthesis of δ -aminolaevulinic acid synthetase in liver parenchymal cells in culture by chemicals that induce acute porphyria. J.Biol.Chem. 238(1963) PC 2247-2249.
36. GRANICK, S.: A test for detection of porphyria-induced drugs. J.Amer.Med.Ass. 190(1964)475-475.
37. GRANICK, S.: The induction in vitro of the synthesis of δ -aminolaevulinic acid synthetase in chemical porphyria: A response of certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. J.Biol.Chem. 241(1966)1359-1375.
38. GRANICK, S. a. H. GILDER: The porphyrin requirements of Haemophilus influenzae and some functions of the vinyl and propionic acid side chains of heme. J.gen.Physiol. 30(1946/7) 1-13.
39. GRANICK, S. a. D. MAUZERALL: Enzymic formation of protoporphyrin from coproporphyrinogen III. Fed.Proc. 17(1958)233-233.
40. GRANICK, S. a. D. MAUZERALL: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting δ -aminolaevulinic acid to coproporphyrinogen. J.Biol.Chem. 232(1958)1101-1117.
41. GRANICK, S. a. G. URATA: Increase in activity of δ -aminolaevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine. J.Biol.Chem. 238(1963)821-827.
42. GÜNTHER, H.: Die Hämatorporphyria. Dtsch.Arch.klin.Med. 105(1911)89-146.
43. HEIKEL, T., W. H. LOCKWOOD a. C. REMINGTON: Formation of non-enzymic haem. Nature, London, 182(1958)313-314.
44. HEILMEYER, L., R. CLOTTEN u. L. HEILMEYER jr.: Die Störungen der Bluthämsynthese. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1964, S. 20 u. S. 102-111.
45. HEIM, W. G., D. APPLEMAN a. H. T. PYERON: Effects of 3-amino-1,2,4-triazole (AT) on catalase and other compounds. Amer.J. Physiol. 186(1956)19-23.

46. HOARE,D.S.a.H.HEATH: Intermediates in the biosynthesis of porphyrins from porphobilinogen by Rhodopseudomonas sphaeroides. Nature,London,181(1958)1592-1593.
47. HOPPE-SEYLER,F.: Medizinisch-chemische Untersuchungen. Tübingen 1871. (Hämatoporphyrin).
48. KAGAWA,Y.,S.MINAKAMI a.Y.YONEYAMA: J.Biochem.(Tokyo), 46(1959)771, zit.nach LEYDEN WEBB,J. Enzyme and metabolic inhibitors, Vol.II, Academic Press, New Aork and London, 1966, S. 888.
49. KIKUCHI,G.,A.KUMAR,P.TALMAGE a.D.SHEMIN: The enzymatic synthesis of δ -aminolaevulinic acid. J.Biol.Chem.233(1958) 1214-1219.
50. KLENK,E.u.M.DOSS: Über das Vorkommen von N-Stearyl-sphingosin-galaktosid im Gehirn und dessen Isolierung. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.342(1965)187-193.
51. KOBLET,H.: Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1964, S. 252-254.
52. KUSCHINSKY,G.u.H.LÜLLMANN: Pharmakologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1966, S. 244-245.
53. LABBE,R.F.,N.HUBBARD a.W.S.CAUGHEY: Porphyrin specificity of ferro: Protoporphyrin chelatase from rat liver. Biochemistry,2(1963)372-274.
54. LASCELLES,J.: The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell suspensions of Rhodopseudomonas sphaeroides. Biochem.J.62(1956)78-93.
55. LASCELLES,J.: Synthesis of porphyrins by cell suspensions of Tetrahymena vorax: effect of members of the vitamin B group. Biochem.J.66(1957)65-72.
56. LASCELLES,J.: Adaption to form bacteriochlorophyll in Rhodopseudomonas sphaeroides: changes in activity of enzymes concerned in pyrrole synthesis. Biochem.J.72(1959) 508-518.
57. LASCELLES,J.: The synthesis of enzymes concerned in bacteriochlorophyll formation in growing cultures of Rhodopseudomonas sphaeroides. J.Gen.Microbiol.23(1960) 487-498.

58. LASCELLES, J.: Tetrapyrrole synthesis in microorganisms, in: *The Bacteria*, ed. by I.C.GUNSALUS, R.Y.STANIER, Vol.III Academic Press, New York and London, 1962, S. 356-357 u. 335-372.
59. LASCELLES, J.: Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation. W.A.Benjamin, Inc. New York, Amsterdam 1964.
60. LAUSEKER, Ch. et al.: Porphyrrie essentielle de l'enfant à propos d'un cas de maladie de Guenther. Traite par acide adenosin-5-monophosphorique. Arch.Franc.Ped.22(1965) 137-165.
61. LAVER, W.G., A.NEUBERGER a.S.UDENFRIEND: Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 1. The formation of δ -aminolaevulinic acid by particles obtained from chicken erythrocytes. Biochem.J.70(1958)4-14.
62. LOCKWOOD, W.H.a.A.BENSON: The enzymic condensation of protobilinogen to porphyrins. Biochem.J.75(1960)372-381.
63. LONDON, I.M., D.SHEMIN a.D.RITTENBERG: Synthesis of heme in vitro by the immature nonnucleated mammalian erythrocyte. J.Biol.Chem.183(1950)749-755.
64. MANNHEIM, W.: Untersuchungen über einen bakteriellen Haemophilus-X-Faktor. I. Nachweis, Produktion und Stabilität des Faktors in komplexen Medien. Zbl.Bakt.I.Orig.198(1965)516-528.
65. MANNHEIM, W.: Limitierende Faktoren in Mischkulturen eines obligaten Aerobiers (*Achromobacter metalcaligenes*) mit *Haemophilus influenzae* resp. mit Aerobiern. Path.Microbiol.29(1966)341-365.
66. MANNHEIM, W.: Untersuchungen über einen bakteriellen Haemophilus-X-Faktor. II. Verbreitung des Wachsfaktors bei heterotrophen Bakterien. Zbl.Bakt.I.Orig.200(1966), 100-109.
67. MANNHEIM, W.: Habilitationsschrift 1967.
68. MANNHEIM, W.u.H.BÜRGER: Untersuchungen über einen bakteriellen Haemophilus-X-Faktor. III. Produktion des Wachsfaktors in definierten Medien. Zbl.Bakt.I.Orig.201(1966)344-356.

69. MANNHEIM, W.u.M.DOSS: Einfluß von Adenosin und 3-Amino-1,2,4-triazol auf Wachstum und Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*. *Z.Naturforsch.* 22b (1967) 359-360.
70. MANNHEIM, W.u.M.DOSS: Unveröffentlicht.
71. MATTHEW, M.a.A.NEUBERGER: Aminomalonat as an enzyme inhibitor. *Biochem.J.* 87 (1963) 601-612.
72. MAUZERALL, D.a.S.GRANICK: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. III. Uroporphyrinogen and its decarboxylase. *J.Biol.Chem.* 232 (1958) 1141-1162.
73. MIE, G.: Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann.Physik* 25 (1908) 377-445.
74. MONOD, J.: Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann, Paris, 1942.
75. MORRIS, J.G.: The synthesis of vitamins and coenzymes, in: *The Bacteria*, ed. by I.C.GUNSALUS, R.Y.STANIER, Vol.III, Academic Press, New York and London, 1962, S. 262-266.
76. MULDER, zit. nach GOLDBERG, A.u.C.RIMINGTON: Diseases of porphyrin metabolism. Charles C Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1962.
77. NENCKI, M.u.N.SIEBER: Über das Hämatoporphyrin. *Arch.exper. Path.u.Pharmakol.* 24 (1888) 430-446.
78. NEUBERGER, A.a.J.J.SCOTT: Aminolaevulic acid and porphyrin biosynthesis. *Nature, London*, 172 (1953) 1093-1094.
79. NEVE, R.A., R.F.LABBE a.R.ALDRIK: Reduced uroporphyrin III in the biosynthesis of heme. *J.Am.Chem.Soc.* 78 (1956) 691-692.
80. NICHOLLS, P.: The reaction between AT and catalase. *Biochim.Biophys.Acta* 59 (1959) 414-420.
81. OCKNER, R.K.a.R.SCHMID: Acquired porphyrie in man and rat due to hexachlorbenzone intoxication. *Nature, London*, 189 (1961) 499-500.
82. OWEN, J.A., H.J.SILBERMANN a.C.GOT: Detection of haemoglobin, haemoglobin-haptoglobin complexes and other substances with peroxylase activity after zone electrophoresis. *Nature, London*, 182 (1958) 1373-1374.

83. OWENS, C.W.: The effect of glutathione in delaying griseofulvin induced porphyria in mice. *Brit.J.Derm.* 76(1964) 81-85.
84. PAPPENHEIMER, A.M.: Diphtheria toxin. III. A reinvestigation of the effect of iron on toxin and porphyrin production. *J.Biol.Chem.* 167(1947)251-259.
85. PAPPENHEIMER, A.M. a. E.D. HENDREE: Diphtheria toxin. IV. The iron enzymes of *Corynebacterium diphtheria* and their possible relation to diphtheria toxin. *J.Biol.Chem.* 171(1947)701-713.
86. PETRES, J., K. SCHRÖDER, U. CONSRUCH a. H.A. Ladner: Porphyrinausscheidung und Serumeisen unter Pyridoxal-5-phosphat bei Porphyria cutanea tarda. *Dtsch.med.Wschr.* 92(1967) 1498-1502.
87. PORRA, R.J. a. J.E. FALK: The enzymic conversion of Coproporphyrinogen III into Protoporphyrin IX. *Biochem.J.* 90(1963) 69-75.
88. PORRA, R.J. a. O.T.G. JONES: Studies on ferrochelatase.
1. Assay and properties of ferrochelatase from a pig-liver mitochondrial extract. *Biochem.J.* 87(1963)181-185.
89. PORRA, R.J. a. O.T.G. JONES: Studies on ferrochelatase.
2. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various haem prosthetic groups. *Biochem.J.* 87(1963), 186-192.
90. RANDERATH, K.: *Dünnschichtchromatographie*. Verlag Chemie, GMBH., Weinheim/Bergstraße, 1962.
91. RIMINGTON, C.: Griseofulvin administration and porphyrin metabolism. A Survey. *Lancet* 1, II(1963)319-322.
92. RIMINGTON, C.: Enzymes and drug sensitivity. Drug and enzyme interactions in porphyrias. *Proc.Royal Soc.Med.* 57(1964)511-514.
93. RIMINGTON, C.: Porphyrin biosynthesis and its control. *Acta Med.Scand.*, Suppl. 445(1966), S.11-24.

94. RIMINGTON, C. et al.: Experimental porphyria in rats induced by chlorinated benzenes. *Biochem. Pharm.* London, 12 (1963) 1387-1397.
95. SANO, S. a. S. GRANICK: Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin formation. *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1173-1180.
96. SANO, S., S. INOUE, Y. TANABE, C. SUMIYA a. S. KOIKE: Significance of mitochondria for porphyrin and heme biosyntheses. *Science*, 129 (1959) 275-276.
97. SAWYER, E. a. R. A. SMITH: δ -Aminolaevulinate synthesis in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Bacteriological Proceedings*, p. 111. Society of American Biologists, Baltimore, 1958.
98. SCHMID, R.: Hepatotoxic drugs causing porphyria in man and animals. *South Afr. J. Lab. Clin. Med.* 9 (1963) 212-219.
99. SCHMID, R. a. S. SCHWARTZ: Experimental porphyria. III. Hepatic type produced by Sedormid. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 81 (1952) 685-689.
100. SHEMIN, D., I. M. LONDON a. D. RITTENBERG: The in vitro synthesis of heme from glycine by the nucleated red blood cells. *J. Biol. Chem.* 173 (1948) 799-800.
101. SHEMIN, D. a. D. RITTENBERG: The biological utilization of glycine for the synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 166 (1946) 621-625.
102. SHEMIN, D. a. C. S. RUSSELL: Delta-aminolaevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 4873-4874.
103. SHEMIN, D., C. S. RUSSELL a. T. ABRAMSKY: The succinate-glycine cycle. I. The mechanism of pyrrole synthesis. *J. Biol. Chem.* 215 (1955) 613-626.
104. SMITH, L.: Cytochrome systems in aerobic electron transport, in: *The Bacteria*, ed. by I. C. GUNSALUS, R. Y. STANIER, Vol. II, Academic Press, New York and London, 1961, S. 365-396.
105. STAHL, E.: *Dünnschichtchromatographie*. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962.

106. STENZEL, W. a. W. MANNHEIM: On the classification and nomenclature of some nonmotile and coccoid diplobacteria, exhibiting the properties of Achromobacteriaceae. Internat. Bull. bact. Nomencl. 13 (1963) 195-200.
107. STICH, W.: Über einen neuen biochemischen Unterschied zwischen humaner akuter Porphyrie und experimenteller Porphyrie. Dtsch. Klin. Wschr. 36 (1958) 386-389.
108. STICH, W. u. H. EISGRUBER: Die Coproporphyrin- und Hämsynthese durch Hefe und ihre Beeinflussung mit B₂-Vitaminen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 287 (1951) 19-39.
109. STOKVIS, B. J. E.: Zur Pathogenese der Hämatorporphyrinurie. Z. klin. Med. 28 (1895) 1.
110. SUGITA, Y.: The role of particulate bound protoporphyrin in biosynthesis of heme. J. Biochem. (Tokyo) 51 (1962) 436-440.
111. SUND, K. A., E. C. PUTALA a. H. N. LITTLE: Reduction of 3-Amino-1,2,4-triazole phytotoxicity in tomato plants. Agric. Food Chem. 8 (1960) 210-212.
112. SWEENEY, G. D. et al.: Effects of cloroquine on patients with cutaneous porphyrie of the "symptomatic" type. Brit. Med. J. 1 (1965) 1281-1285.
113. TEPHLY, T. R., G. J. MANNERING a. R. E. PARKS: Studies on the mechanism of inhibition of liver and erythrocyte catalase activity by 3-Amino-1,2,4-triazole (AT). J. Pharm. exp. Ther. (Baltimore) 134 (1961) 77-82.
114. THUDICHUM, J. L. W.: 10th Report of the Medical Officer of the Privy Council, London, 1867, Appendix 7, 152.
115. URATA, C. a. S. GRANICK: Biosynthesis of α -aminoketones and the metabolism of aminoacetone. J. Biol. Chem. 238 (1963) 811-820.
116. VAN NIEL, C. B.: Bacteriolog. Rev. 8 (1944) 1, zit. nach LASCELLES, 1964 (59), S. 35.
117. WALDENSTRÖM, J.: Studium über Porphyrie. Acta med. Scand. Suppl. 82 (1937) 3-155.
118. WALDRON, H. A.: Plasmaporphyrins in lead workers. Brit. J. Industr. Med. 21 (1924) 315-317.

119. WESTALL, R.G.: Isolation of porphobilinogen from the urine of a patient with acute porphyria. *Nature, London*, 170 (1952) 614-616.
120. WHITE, D.C. a. S. GRANICK: Hemin biosynthesis in *Haemophilus*. *J. Bact.* 85 (1963) 842-850.
121. WHITE, D.C., G. LEIDY, J. D. JAMISON a. R. E. SHOPE: Porcine contagious pleuropneumonia. III. Interrelationships of *Haemophilus pleuropneumoniae* to the other species of *Haemophilus*: nutritional, metabolic, transformation and electron microscopic studies. *J. exper. Med.* 120 (1964) 1-12.
122. YONEYAMA, Y., H. OHYAMA, Y. SUGITA a. H. YOSHIKAWA: Iron-chelating enzyme from duck erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 62 (1962) 261-268.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten

in Marburg: Bommer, Bücher, Dimroth, Dölle, Gedigk,
Hensel, Hering, Heuser, Janke, Klingenberg, Korb,
Kottmeyer, Lang, Mahr, Mann, Marx, Maurath, Niemeyer,
Niessing, Pantke, Petry, Rodeck, Rosemann, Schiff,
Schmid, Seidel, Siegert, Strohmeyer, Vogt, Walcher;

in Freiburg: Beck, Eschler, Heite, Hoffmann, Hummel,
Körber, Noltenius, Rehm, Schilli, Schreiber.

Herrn Prof. Dr. R. Siegert, Direktor des Hygiene-Instituts der Universität Marburg, danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung bei der Durchführung der Arbeit. Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Mannheim und Herrn Dr. M. Doss, Facharzt für Laboratoriumsdiagnostik, bin ich für die experimentelle Einarbeitung und Anleitung sowie für die kritische Diskussion der Ergebnisse zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf.

Am 14. Januar 1941 wurde ich als Tochter des Zahnarztes Dr. Wilhelm Keulmann und seiner Ehefrau Anna Paula, geb. Ulrich, Zahnärztin, in Bad Hersfeld geboren. Während Kindheit und Schulzeit lebte ich in meiner Heimatstadt Bebra. Im März 1952 bestand ich die Aufnahmeprüfung des Mädchengymnasiums in Bad Hersfeld. Ich besuchte den Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Zweig und legte im März 1961 dort die Reifeprüfung ab. Zum Sommersemester 1961 immatrikulierte ich mich an der Philipps-Universität Marburg für das Fach Zahnmedizin. Nach 5 Semestern legte ich im Oktober 1963 meine Zahnmedizinische Vorprüfung in Marburg ab. Im Sommersemester 1964 und im Wintersemester 1964/65 studierte ich an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Zum Sommersemester 1965 kam ich nach Marburg zurück und verbrachte die beiden letzten klinischen Semester an der Philipps-Universität. Nach dem 10 Semester meldete ich mich zum Staatsexamen und beendete es mit Erfolg am 12. August 1966. Im Hygiene-Institut der Universität Marburg (Direktor Prof. Dr. R. Siebert) führte ich anschließend bis Juli 1967 die Arbeiten für meine Dissertation über das Thema "Untersuchungen über die Porphyrinsynthese aus δ -Aminolävulinsäure bei *Achromobacter metalcaligenes*" durch. Seit September 1967 leiste ich meine Pflichtassistentenzeit in einer zahnärztlichen Praxis ab.

